

Möglichkeiten der simultanen Untersuchung von Freisetzung und Absorption schwer-wasserlöslicher Arzneistoffe aus festen oralen Darreichungsformen durch biorelevante in vitro Modelle

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Diplom-Pharmazeut Martin Ludwig Pfefferle

aus Buchloe

Tübingen

2010

Tag der mündlichen Qualifikation: 20. Oktober 2010

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin A. Wahl

2. Gutachter: Prof. Dr. Rolf Daniels

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von

Herrn Professor Doktor Martin A. Wahl

am Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Meinem verehrten Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Martin A. Wahl, danke ich für die Bereitschaft, das Thema zur Verfügung zu stellen und auch nach der Verschiebung des Fokusses zu betreuen. Besonders seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und seine ruhige und freundliche Art haben dazu beigetragen, die Arbeit auch in weniger guten Zeiten zu tragen.

Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels danke ich für seine spontane Bereitschaft zur Anfertigung des Zweitgutachtens und die stets herzliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl.

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde bei Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG in Biberach (Riß) durchgeführt. Für die Möglichkeit, das Thema in der pharmazeutischen Industrie bearbeiten zu können und zu betreuen, sowie seine Diskussionsbereitschaft, danke ich Herrn Dr. Georg Böck.

Auch an Herrn Dr. Sven Schreder geht mein Dank für die Ermöglichung der Arbeiten in der Abteilung für pharmazeutische Forschung und Entwicklung.

Die Kultivierung der Caco-2-Zellen wurde im Labor von Herrn Dr. Bernhard Schmid und seinen Mitarbeiterinnen, Frau Caroline Andres, Frau Petra Diemar-Epple, Frau Heidi Roth, Frau Sabine Rudolf und Frau Stephanie Stohr durchgeführt. Ihm und vor allen seinen Mitarbeiterinnen gilt mein herzlicher Dank für ihre Unterstützung und die häufige Entlastung bei der Zellkultivierung.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen der Gruppe Neue Technologien und externe Kooperationen (Dieter Wessel, Thomas Kirchmaier, Dr. Olaf Behrend, Dr. Rolf Brickl, Birgit Schwarz, Thomas Linkh und PD Dr. Karl-Gerhard Wagner) bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft.

Besonderer Dank geht an Frau Dr. Julia Boni, Herrn Dr. Khaled Hussein und Herrn Ulrich Heigoldt für die enge Zusammenarbeit, den herzlichen Umgang und die jederzeitige Bereitschaft zur Hilfe.

Herrn Matthäus Müller möchte ich danken für die Konstruktion und die Anfertigung der Diffusionszellen.

Allen Kollegen am Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie gilt mein Dank für die herzliche Aufnahme und die Unterstützung bei der Betreuung des Praktikums. Ihnen wünsche ich viel Erfolg für die weitere Arbeit an ihren Projekten und der Erstellung ihrer Dissertationen.

Meinen lieben Eltern, Frau Helga Pfefferle und Herrn Ludwig Pfefferle, danke ich für die Ermutigung zur Promotion und das stets gezeigte Vertrauen in meine Fähigkeiten.

Besonderer Dank gilt meiner geliebten Frau Caroline Pfefferle. Ohne sie und ihre liebevolle Betreuung in schlechten Zeiten, sowie ihrer Geduld und ihrem Vertrauen wäre die vorliegende Arbeit vermutlich nicht erfolgreich beendet worden.

Meiner Familie
in Liebe und Dankbarkeit

Teile dieser Arbeit wurden bereits öffentlich vorgestellt:

Kongressbericht

Martin L Pfefferle; Georg Boeck, Martin A Wahl

An Automated Dynamic Caco-2 Model to Screen the Influence of Pharmaceutical Excipients on Absorption

Abstract und Poster: 2009 AAPS Annual Meeting and Exposition; 8. – 12. November 2009; Los Angeles, USA

Weitere Artikel mit Beteiligung des Autors dieser Arbeit:

Julia-Elisabeth Boni, Rolf S. Brickl, Jennifer Dressman, Martin L. Pfefferle

Instant FaSSIF and FeSSIF - Biorelevance meets practicality

Dissolution Technologies; 2009; 16 (3), 41 - 45

Verzeichnis der Abkürzungen

A, B, C etc.	Unterschiedliche Buchstaben in Diagrammen kennzeichnen unterschiedliche, in den jeweiligen Diagrammen dargestellte Kurven
AF	Arzneiform
AP	apikal
AS	Arzneistoff
BL	basolateral
ca.	circa
DAD	Dioden-Array-Detektor
et al.	et alii
GIT	Gastrointestinaler Trakt
h	Stunden
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPLC-MS	Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit massenspektrometrischer Auswertung
i.v.	intravenös
IVIVC	In vivo in vitro Korrelation
KI	Konfidenzintervall
min	Minuten
s / sek	Sekunden
SPE	Festphasenextraktion
UV	ultravioletter Bereich des Spektrums
z.B.	zum Beispiel

Besonderer Hinweis:

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1	Biorelevanz	2
1.1.1	Anatomie des Darmes	3
1.1.2	Transitzeiten durch den gastrointestinalen Trakt	5
1.1.3	pH-Verlauf über den gastrointestinalen Trakt	5
1.1.4	Absorption von Stoffen aus dem gastrointestinalen Trakt	6
1.2	Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem (BCS)	7
1.3	Standard Freisetzungsapparate	11
1.4	In vivo/in vitro Korrelation (IVIVC)	12
1.4.1	Charakterisierung von Formulierungen	12
1.4.2	Erstellen einer IVIVC	14
1.4.3	Korrelationsstufen im Rahmen einer IVIVC	15
1.4.3.1	Level A-Korrelation	15
1.4.3.2	Level B-Korrelation	16
1.4.3.3	Level C-Korrelation	16
1.4.3.4	Multiple-Level C-Korrelation	16
1.4.3.5	Level D-Korrelation	16
1.4.4	Umwandlung der Plasmaspiegeldaten durch numerische Dekonvolution	17
1.5	Möglichkeiten die Biorelevanz bei in vitro Versuchen zu erhöhen	20
1.5.1	Verwendung simulierter intestinaler Flüssigkeiten	20
1.5.2	Entfernung des Wirkstoffs aus dem Freisetzungskompartment	21
1.6	Caco-2-Zellen	23
1.6.1	Herkunft und Allgemeines	23
1.6.2	Einfluss von Hilfsstoffen auf die Permeabilität	24
1.6.2.1	Modulation von tight-junctions	25
1.6.2.2	Interaktion mit der Zellmembran	26
1.6.2.3	Inhibition von P-gp	26

1.7	Kombinierte Systeme	27
1.7.1	Statisches System	27
1.7.2	Dynamische Systeme	28
1.7.2.1	Das Modell von Ginski et. al.	29
1.7.2.2	Das Modell von Miyazaki et al.	30
1.7.2.3	Das Modell von Kataoka et al.	31
1.7.2.4	Das Modell von Motz et al.....	32
1.8	Zielsetzung.....	33
2	MATERIAL UND METHODEN.....	39
2.1	IVIVC.....	39
2.1.1	UIR und Dekonvolution	39
2.1.2	Vergleiche zwischen in vitro und in vivo Daten.....	40
2.2	Caco-2-Zellen	42
2.2.1	Material.....	42
2.2.2	Zellkultur	42
2.2.3	Passagieren.....	43
2.2.4	Kultivierung von Caco-2-Zellen auf Filtereinsätzen	43
2.2.5	Durchführung von Versuchen	45
2.2.6	Transportpuffer	45
2.2.7	Versuchsvorbereitung	46
2.2.8	Statische Experimente	46
2.2.8.1	Durchführung dynamischer Versuche	47
2.2.8.2	Durchführung dynamischer, kombinierter Versuche	48
2.2.9	Ermittlung des effektiven Permeationskoeffizienten	48
2.3	SPE-Apparatur	49
2.3.1	Versuchsdurchführung an der SPE-Apparatur	49
2.3.2	Versuchsvorbereitung	50
2.3.3	Versuche mit Säure	50
2.3.4	Freisetzungsversuche.....	50
2.3.4.1	Freisetzungsversuche ohne pH-Modifikation	50
2.3.4.2	Freisetzung mit pH-Modifikation.....	51
2.3.5	Wiederfindung	51
2.3.6	Reinigung der Säule	51

3	ERGEBNISSE	53
3.1	Umwandlung der Plasmakurven zu in vivo Absorptionskurven	53
3.1.1	Bestimmung der Gewichtsfunktion.....	53
3.1.2	Dekonvolution der Plasmaspiegelkurven	55
3.2	Permeationsversuche mit Caco-2-Zellen	57
3.2.1	Aufbau und Entwicklung des Caco-2-Modells	57
3.2.1.1	Aufbau der dynamischen Caco-2-Apparatur	59
3.2.1.2	Probleme bei der Entwicklung der Apparatur	61
3.2.2	Qualifizierung der Polyester-Filter.....	62
3.2.3	Ergebnisse der Qualifizierung der Apparatur.....	63
3.2.4	Hilfsstoffscreening mit Apafant.....	65
3.2.5	Qualifizierung von 44 cm ² -Membranen für Caco-2-Versuche.....	71
3.2.5.1	Vergleich der Permeationskoeffizienten	71
3.2.5.2	Dynamisierung der Versuche mit 44 cm ² -Membranen	72
3.2.6	Ergebnisse der kombinierten, dynamischen Experimente.....	75
3.2.6.1	Freisetzung der Arzneiformen.....	75
3.2.6.2	Permeierte Mengen	77
3.2.6.3	Permeationskoeffizienten.....	79
3.2.7	Bewertung der Ergebnisse der dynamischen Caco-2-Apparatur.....	81
3.3	Ergebnisse der SPE-Apparatur.....	84
3.3.1	Aufbau der SPE-Apparatur	85
3.3.2	Ermittlung der optimalen hardwareseitigen Parameter.....	88
3.3.3	Vergleiche unterschiedlicher Pumpgeschwindigkeiten	89
3.3.4	Verhalten von pH-Modifikatoren im SPE-Modell.....	91
3.3.5	Verbesserung der Biorelevanz.....	92
3.3.5.1	Verwendung von Pumpprogrammen.....	93
3.3.5.2	Verwendung von pH-Programmen.....	96
3.3.6	Überprüfung der IVIVC	101
3.3.7	Bewertung der SPE-Ergebnisse	104
4	ZUSAMMENFASSUNG	107

5	ANHANG	113
5.1	Verwendete Materialien und Geräte	113
5.1.1	Eingesetzte Hard- und Software	113
5.1.2	Materialien der Zellkultur	114
5.2	Programm zum automatischen Probenzug durch die SIA-Anlage	115
5.3	Analytische Methoden	118
5.3.1.1	Theophyllin (HPLC)	118
5.3.1.2	Apafant (HPLC)	119
5.3.1.3	BIXX (HPLC)	120
5.3.1.4	BIXX (UV)	121
5.4	Verzeichnis der Abbildungen	122
5.5	Verzeichnis der mathematischen Gleichungen	126
5.6	Verzeichnis der Tabellen	127
6	LITERATURVERZEICHNIS	129
7	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	139
8	LEBENS LAUF	140

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Bestimmung des in vitro Freigabeprofils von Arzneiformen ist eines der wichtigsten Werkzeuge in der pharmazeutischen Industrie. So werden sowohl in der Qualitätskontrolle als auch während der Entwicklung neuer Arzneiformen Dissolutionsversuche durchgeführt. Während durch die Qualitätskontrolle Chargen untereinander verglichen werden und auf Bioäquivalenz getestet wird, liegt das Augenmerk während der Entwicklung neuer Formulierungen auf dem Verlauf des Freigabeprofils. Dieses kann unter anderem als Indikator für die Funktion des gewählten Freisetzungsmechanismus dienen, wodurch die Optimierung des Formulierungsansatzes und die Auswahl geeigneter Prototypen möglich werden.

Allerdings werden einerseits die physiko-chemischen Eigenschaften neuer Wirkstoffe immer komplizierter und andererseits die Anforderungen der Zulassungsbehörden an die Vorhersagekraft der verwendeten in vitro Methoden immer höher. Aus diesen Umständen heraus wird es für die pharmazeutische Industrie immer wichtiger, in vitro Testmethoden zur Verfügung zu haben, welche vorhersagen können, wie sich der Wirkstoff im Körper verhalten wird. Außerdem sollten die in vitro Modelle schon vor klinischen Studien eine Aussage ermöglichen, welche entwickelten Arzneiformen bzw. Prototypen den Wirkstoff wie schnell freisetzen können. Dies ist gerade bei Formulierungen mit modifizierter Wirkstofffreisetzung, wie zum Beispiel Retardarzneiformen, wichtig, da diese den Wirkstoff über einen längeren Zeitraum freigeben. Die resultierenden Plasmaspiegel lassen sich allerdings nur schwer durch die heute üblichen in vitro Methoden abbilden.

Die Anpassungen der in vitro Tests an die in vivo Situation bzw. das Maß, mit dem die Vorhersagen einen Bezug auf das Schicksal von Wirkstoff oder Arzneiform im menschlichen Körper haben, werden mit dem Begriff „Biorelevanz“ belegt. Durch eine Erhöhung der Vorhersagegenauigkeit von in vitro Methoden wird es möglich, sowohl Geld für klinische Studien einzusparen, als auch die Entwicklung von Prototypen zu beschleunigen. In der Folge können die Pharmaunternehmen bei gleichem Kostenaufwand mehr Wirkstoffe parallel entwickeln. Sie sind so in der Lage, bessere und für das Gesundheitswesen auch günstigere, neuartige Therapiemöglichkeiten zu eröffnen.

1.1 Biorelevanz

Geht man von einer peroralen Arzneiform aus, müssen verschiedene Prozesse ablaufen, bevor der Arzneistoff bioverfügbar ist:

Arzneiform → Desintegration → Dissolution/Auflösung → Absorption

Jeder der genannten Teilschritte wird durch verschiedene Prozesse und Stoffe im gastrointestinalen Trakt beeinflusst. Dabei sind unter anderem zu nennen (modifiziert und erweitert nach Lobenberg et al. 2000):

- Magenentleerung^{x+}
- lokale pH-Werte^{x+}
- Transitzeiten⁺
- Resorptionsfläche und -geschwindigkeit⁺
- Volumen und Volumenfluss⁺
- Permeabilität^{x+}
- Gallensalze und Lipide⁺
- Magen- und Darmmotilität⁺
- Enzyme⁺
- Nahrungsaufnahme
- Darmflora

Auf die mit x gekennzeichneten Parameter kann durch geeignete Formulierungsentwicklung Einfluss genommen werden. Die mit + markierten können wiederum durch geeignete in vitro Versuchsbedingungen abgebildet werden. Je weiter man sich innerhalb der in vitro Experimente den realen Bedingungen im menschlichen Gastrointestinaltrakt annähert, desto höher ist das Maß an Biorelevanz, das erreicht wird. Diese Bedingungen und welche Möglichkeiten der Annäherung bestehen, wird in den folgenden Abschnitten erläutert. Durch die Erhöhung der Biorelevanz wird eine genauere und damit bessere Vorhersage des in vivo Verhaltens von sowohl Arzneistoff als auch Arzneiform im menschlichen Körper möglich. Diese Zusammenhänge werden durch den Begriff in vivo/in vitro Korrelation (IVIVC) zusammengefasst (Abschnitt 1.4). Eine genaue Definition, was zum Erarbeiten einer IVIVC nötig ist, wird durch die FDA gegeben (FDA 1997a).

Da die meisten Arzneistoffe peroral appliziert werden, ist der gastrointestinale Trakt der Ort, an dem sowohl Dissolution als auch Resorption von Arzneistoffen stattfinden muss. Eine detaillierte Aufzählung der im gastrointestinalen Trakt befindlichen Strukturen ist in Abbildung 1-1 dargestellt. Er besteht aus dem Magen, dem Dünndarm und dem Dickdarm. Der Magen mit einer Oberfläche von nur 0,11 m² spielt für die Absorption von Arzneistoffen nur eine untergeordnete Rolle (Ritschel 1991). Allerdings sind die Bedingungen im Magen wichtig für die Freisetzung von Wirkstoffen aus immediate release-Arzneiformen.

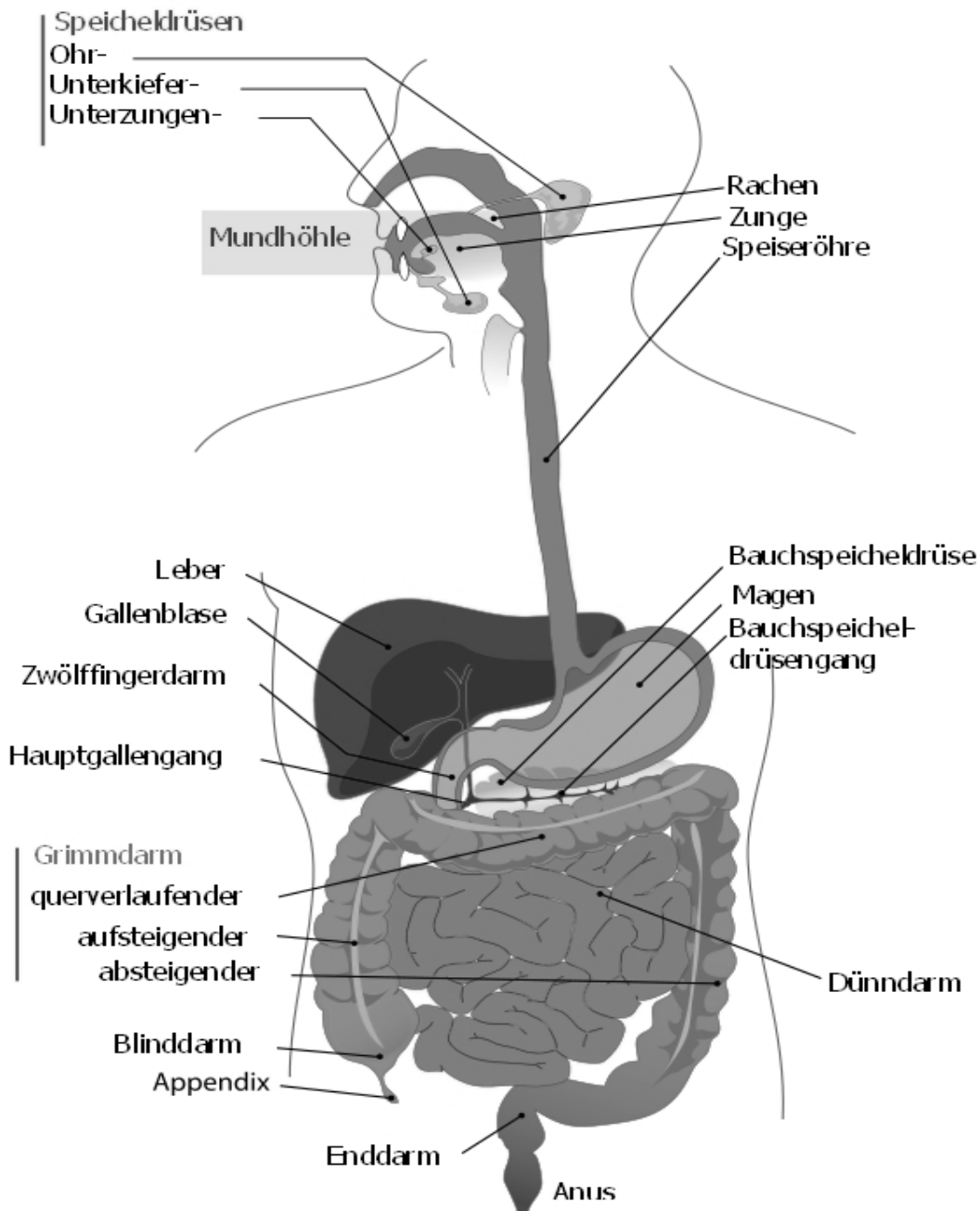


Abbildung 1-1: Gastrointestinaler Trakt (www.wikipedia.de)

1.1.1 Anatomie des Darmes

Der Darm ist aufgeteilt in Dünndarm, Dickdarm und Rektum. Die weitere Unterteilung dieser Abschnitte sowie deren Länge und die entsprechenden Oberflächen sind in Tabelle 1-1 aufgezählt. Er kann als Kanal betrachtet werden, der von Epithel ausgekleidet ist. Zwischen den Epithelzellen, die selbst keinen Schleim produzieren, sitzen Becherzellen, die für die Produktion von schützendem Mucus verantwortlich sind. Unter der Mucosa, der Schleimhaut, sitzt die Submucosa, in der die Blutgefäße verlaufen (Abbildung 1-2).

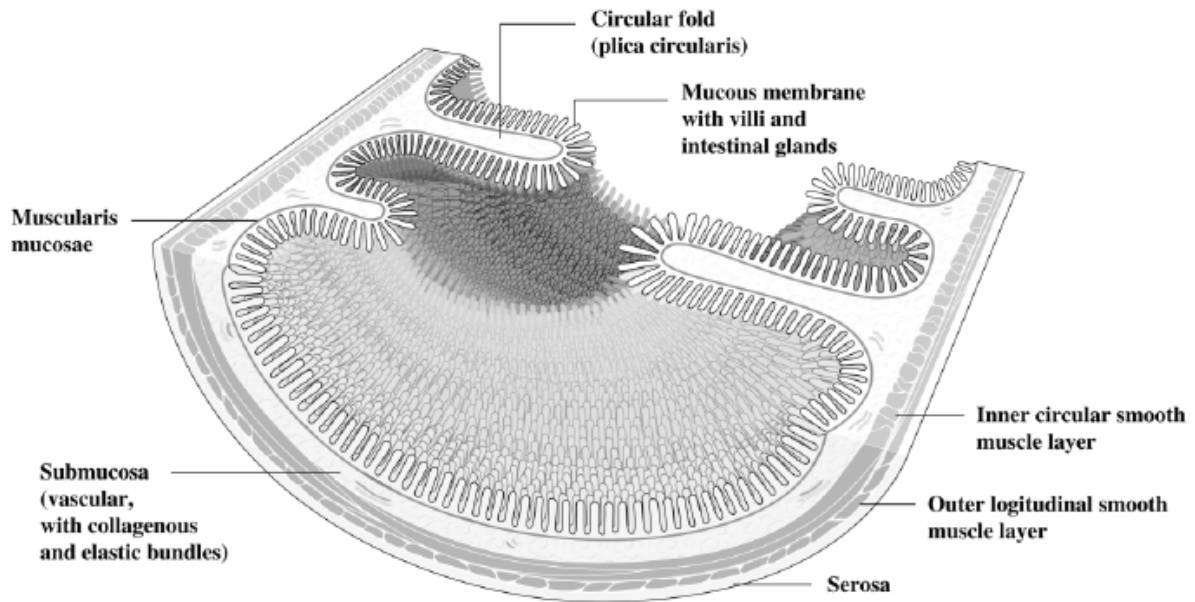


Abbildung 1-2: Aufbau des Darmes (DeSesso et al. 2001)

Abschnitt	Teilabschnitt	Länge [cm]	Oberfläche [m ²]
Dünndarm	Duodenum	25	0,09
	Jejunum	300	60
	Ileum	300	60
Dickdarm	Caecum	30	0,05
	Colon	150	0,25
Rectum		15 - 20	0,015
Summe		ca. 700	ca. 120,5

Tabelle 1-1: Länge und relative Oberfläche der Darmabschnitte (Kararli 1995)

Die Mucosa des Darms wird durch verschiedene Strukturen vergrößert, um durch die Erhöhung der Oberfläche eine bessere und vollständige Absorption von Nahrungsbestandteilen zu gewährleisten. Dies geschieht durch Einstülpungen der Darmwand, den Kerckringschen Falten. Im Dünndarm sind diese zusätzlich mit ungefähr 1 mm großen Zotten besetzt. Auf den Epithelzellen der Zotten befinden sich die zusätzlich oberflächen-vergrößernden Microvilli. Insgesamt wird die Oberfläche durch die aufgezählten Strukturen um den Faktor 600 vergrößert (Abbildung 1-3).

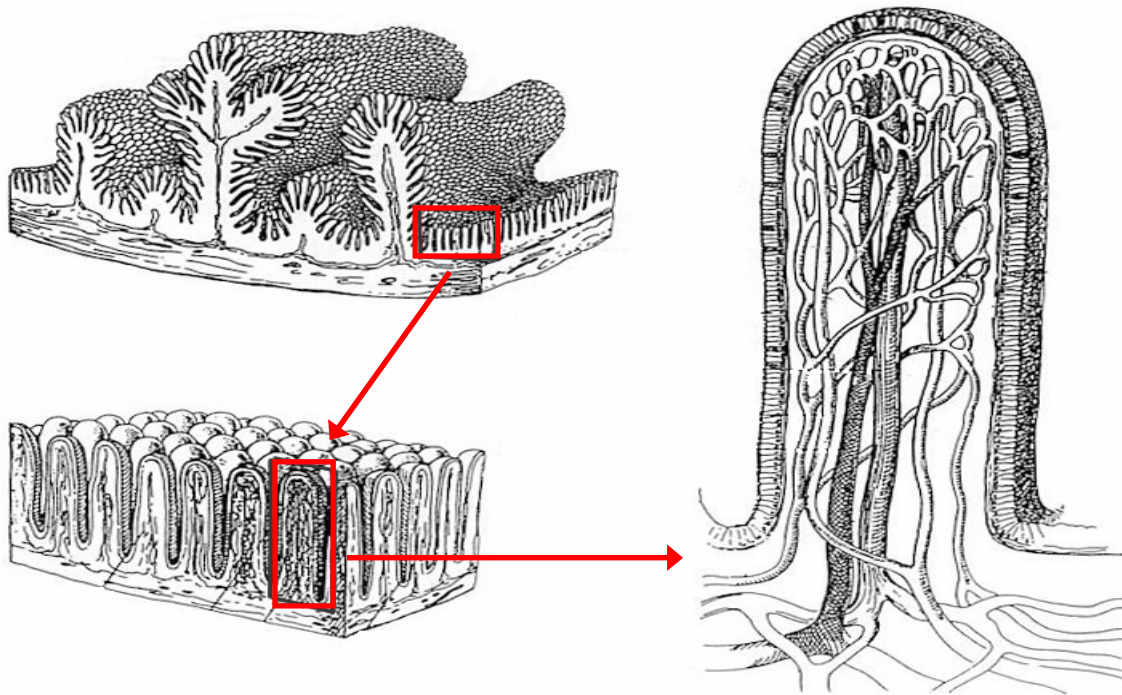


Abbildung 1-3: Oberflächenvergrößerung im gastrointestinalen Trakt (Reppas et al. 1995)

Da im Colon kaum noch Zotten und Microvilli anzutreffen sind, ist die relative Oberfläche verglichen mit dem Dünndarm gering (DeSesso et al. 2001; Kararli 1989).

1.1.2 Transitzeiten durch den gastrointestinalen Trakt

Die Transitzeiten durch den menschlichen Verdauungstrakt unterliegen starken interindividuellen Schwankungen. Allein bei der Magenentleerung lassen sich in der Literatur Werte zwischen 10 Minuten und 2 Stunden finden (Weitschies 2001). Die Passagezeit des Dünndarmes stellt sich im Vergleich dazu relativ konstant dar und beträgt in der Regel 3 bis 5 Stunden (Malagelada et al. 1984). Das Colon wird wiederum mit hohen interindividuellen Schwankungen passiert. Die Dickdarmtransitzeiten schwanken zwischen 6 und 42 Stunden bei Männern und 22 und 56 Stunden bei Frauen (Bouchoucha et al. 2006).

1.1.3 pH-Verlauf über den gastrointestinalen Trakt

Mit einem pH-Wert von etwa 2 ist der Magen sehr sauer (Dressman et al. 1990). Nach dem Übertritt in das Duodenum steigt der pH-Wert schnell auf Werte von 5 bis 6,5 an. Dies wird durch Sezernierung eines Hydrogencarbonatpuffers erreicht. Während des Transits durch den weiteren Verlauf des Dünndarms, steigt der pH-Wert durch weitere Absonderung alkalischen Puffers bis zum Erreichen des Ileums auf ca. 7 an. Postprandial sind die Werte etwas

höher bzw. werden durch die Nahrungsbestandteile schneller erreicht (Evans et al. 1988; Malagelada et al. 1976; Ovesen et al. 1986). Mit Erreichen des Colons fällt der pH-Wert kurzzeitig auf ungefähr 6 ab und steigt während der Dickdarmpassage wieder auf den am Ende des Dünndarm erreichten Wert von 7 an (Gruber et al. 1987).

1.1.4 Absorption von Stoffen aus dem gastrointestinalen Trakt

Da die meisten Arzneistoffe passiv durch das Epithel des Intestinums diffundieren, ist die in Abschnitt 1.1.1 beschriebene Oberflächenvergrößerung der Mucosa entscheidend für die quantitative Aufnahme von Stoffen aus dem gastrointestinalen Trakts in die Blutbahn. Der zugrunde liegende Vorgang wird gut durch das erste Fick'sche Gesetz beschreiben (Gleichung 1-1). Aus dieser Gleichung wird deutlich, dass der Konzentrationsgradient zwischen Darmlumen (apikal) und Blutbahn (basolateral) die treibende Kraft für die Aufnahme von passiv transportierten Stoffen in den Körper ist. Die aufgenommene Menge ist proportional der zur Verfügung stehenden Oberfläche.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{A \cdot D_M}{h} \cdot (C_a - C_b)$$

Gleichung 1-1: Erstes Fick'sches Gesetz

dX/dt	Aufgenommene Menge pro Zeit
A	Oberfläche
D_M	Diffusionkoeffizient des Stoffs
h	Dicke der Barriere
c_a bzw. c_b	apikale bzw. basolaterale Konzentration

Nachdem ca. 99 % der Oberfläche des Verdauungstraktes im Dünndarm lokalisiert sind, ist dieser Bereich der entscheidende Abschnitt für die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen. Dementsprechend sollten die Substanzen innerhalb des Zeitfensters, in dem die Arzneiform den Dünndarm passiert, gelöst vorliegen. Aussagen über die Aufnahme von Wirkstoffen aus dem Darm können durch prädikative in vitro Modelle gewonnen werden. Eine der Möglichkeiten diese Daten zu gewinnen, ist der Einsatz von Darmzellkulturen. Die am weitesten verbreitete Zelllinie ist die Caco-2-Linie, mit der auch in dieser Arbeit Versuche unternommen werden (Artursson et al. 1991).

1.2 Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem (BCS)

Unter Anwendung des BCS erfolgt eine Einteilung von Arzneistoffen nach Löslichkeit und intestinaler Permeabilität. Durch diese beiden Parameter ist die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Absorption von Arzneistoffen aus festen peroralen Arzneiformen bestimmt (Amidon et al. 1995). Mit Hilfe des BCS können einerseits IVIVC für schnell freisetzende Formulierungen entwickelt und andererseits Parameter für die Dissolutionstests der jeweiligen Arzneiformen festgesetzt werden (Dressman et al. 1998b).

Die Arzneistoffe werden dementsprechend in vier Klassen eingeteilt (Tabelle 1-2):

Klasse	Löslichkeit	Permeabilität	IVIVC
1	hoch	hoch	IVIVC wenn die Freisetzung langsamer abläuft als die Magenentleerung; sonst begrenzte oder keine Korrelation
2	niedrig	hoch	IVIVC wenn in vitro Dissolution ähnlich in vivo Dissolution
3	hoch	niedrig	begrenzte IVIVC da die Permeation der bestimmende Schritt ist
4	niedrig	niedrig	höchstens begrenzte IVIVC

Tabelle 1-2: BCS-Klassen und die zu erwartende IVIVC

Anhand der Einschätzung über die IVIVC in Tabelle 1-2 kann man ablesen, welche der drei Klassen bei Formulierungsentwicklung und Entwicklung besonderes Augenmerk benötigen. So sind bei allen Substanzen, außer solchen aus Klasse 1, Probleme bezüglich der in vivo Performance von Wirkstoff und Arzneiform oder der in vitro Charakterisierung zu erwarten.

Innerhalb des BCS wird das zu erwartende Verhalten der Arzneistoffe durch drei dimensionslose Zahlen charakterisiert: Dissolutionszahl (D_n ; Gleichung 1-2), Absorptionszahl (A_n ; Gleichung 1-3) und Dosiszahl (D_o ; Gleichung 1-4). Bei Stoffen mit guter Bioverfügbarkeit ist D_n sowie A_n hoch, und D_o niedrig. Die Löslichkeit der Stoffe findet sich in D_n und D_o wieder.

Dissolutionszahl D_n

$$D_n = \frac{MRT_{GIT}}{MDT} = \frac{(\pi * R^2 * L/Q)}{(\rho * r_0^2 / 3D * C_s^{min})}$$

Gleichung 1-2: Dissolutionszahl

MRT_{GIT} : mittlere Verweildauer des Stoffes im Darm (mean residence time)

MDT : mittlere Dissolutionsdauer (mean dissolution time)

R : Radius des Darmabschnittes

L : Länge des Darmabschnittes

Q : Flussrate

ρ : Dichte des Partikels

r_0 : Partikelradius (bei $t=0$)

D : Beschleunigung des Partikels

C_s^{min} : Sättigungslöslichkeit am pH-Wert der schlechtesten Löslichkeit

Die Dissolutionszahl beschreibt den Anteil der Freisetzung des Wirkstoffes an der gesamten Verweildauer des Stoffes im Darm(-abschnitt). Eine hohe Dissolutionszahl kann als Anhaltspunkt für hohe zu erwartende Bioverfügbarkeit des jeweiligen Stoffs angesehen werden, da der Stoff schnell zur Absorption zur Verfügung steht.

Absorptionszahl (A_n)

$$A_n = \frac{MRT_{GIT}}{MAT} = \frac{(\pi * R^2 * L/Q)}{(R/P_{eff})}$$

Gleichung 1-3: Absorptionszahl

MAT : mittlere Absorptionsdauer (mean absorption time)

P_{eff} : effektiver Permeationskoeffizient

Die Absorptionszahl dient als Maß für die Geschwindigkeit, mit der ein Stoff nach seiner Auflösung aus dem Darm aufgenommen wird. Je schneller er im Vergleich zu seiner Verweildauer im jeweiligen Darmabschnitt resorbiert wird, desto höher ist die Absorptionszahl und desto höher ist die zu erwartende Bioverfügbarkeit.

Dosiszahl D_o

$$D_o = \frac{\text{Dosis}}{(V_o * C_s^{\text{min}})}$$

Gleichung 1-4: Dosiszahl

Dosis: (maximal) eingesetzte Dosis eines Wirkstoffs

V_o : zur Einnahme aufgenommene Flüssigkeit (250 ml; FDA 2000)

Die Dosiszahl gibt an, wie oft ein Volumen von 250 ml nötig ist, um die gesamte Dosis eines Arzneistoffs bei einem bestimmten pH-Wert in Lösung zu bringen. Das Volumen von 250 ml ergibt sich aus der Flüssigkeitsmenge, mit der eine Arzneiform in klinischen Studien eingenommen werden soll (FDA 2000). Je mehr Flüssigkeit zur Auflösung eines Stoffes nötig ist, desto schlechter ist seine Löslichkeit und desto schwieriger ist es, die gesamte Dosis bioverfügbar zu machen.

Von einer guten Bioverfügbarkeit kann ab einer 90 prozentigen Absorption gesprochen werden (FDA 1997b). Zur Ermittlung der zu erwartenden Absorption können auch geeignete in vitro Modelle, wie das bereits erwähnte Caco-2-Zellmodell, verwendet werden. Der geforderten Absorption von 90 % entsprechen Permeationskoeffizienten in vivo von $1 - 2 \cdot 10^{-4}$ cm/s. Bei Verwendung des Caco-2-Modell bedeutet dies, dass Permeationskoeffizienten von $1 \cdot 10^{-5}$ erreicht werden müssen (Yee 1997).

Durch Kenntnis der in vivo Permeationskoeffizienten kann dann die absorbierte Fraktion gemäß Gleichung 1-5 berechnet werden:

$$F = 1 - e^{-2A_n}$$

Gleichung 1-5: Berechnung der absorbierten Fraktion

Für Klasse 2-Substanzen, bei denen die Auflösung langsamer erfolgt, als der Zerfall der Arzneiform, wird die absorbierte Fraktion gemäß Gleichung 1.6 ermittelt:

$$F = \frac{2A_n}{D_o}$$

Gleichung 1-6: absorbierte Fraktion für BCS 2-Substanzen

1 Einleitung und Zielsetzung

Zur weiteren Verfeinerung des bisher gültigen Klassifizierungssystems gibt es Bestrebungen, das Klassifizierungssystem auch auf retardierte Formulierungen anzuwenden. Corrigan versucht ein BCS zu entwickeln, das dies vermag und teilt die Stoffe in fünf Klassen ein. Diese Klassen unterscheiden zwischen ortsunabhängiger und ortsabhängiger Löslichkeit und Absorption (Tabelle 1-3; Corrigan 1997). Er greift dabei auch die Idee des Absorptionsfensters auf (Rouge et al. 1996), nach der manche Stoffe nicht über den gesamten Darm resorbierbar sind.

Klasse	Verhalten in vivo
1	Hohe Löslichkeit unabhängig vom Ort
1a)	Hohe Permeabilität unabhängig vom Ort
1b)	Permeabilität abhängig vom Ort – enges Absorptionsfenster
2	Begrenzte Löslichkeit, ortsabhängig
2a)	Hohe Permeabilität unabhängig vom Ort
2b)	Permeabilität abhängig vom Ort – enges Absorptionsfenster
5	Variable Löslichkeit und Permeabilität
5a)	Hohe Sättigungslöslichkeit im oberen gastrointestinalen Trakt, niedrige Sättigungslöslichkeit im unteren gastrointestinalen Trakt – entgegengesetzter Effekt auf P_{eff}

Tabelle 1-3: BCS-Klassen nach Ausmaß und Ort von Löslichkeit und Permeabilität

Eine weiterer Versuch das BCS zu erweitern, wurde dahingehend unternommen, dass auch die Elimination und eventuelle Efflux-Effekte in die Kategorisierung aufgenommen wurden (Schulte et al. 2003). Die Annahme, die diesem biopharmazeutischen Dispositionssystem zugrunde liegt ist, dass Stoffe, die eine hohe Permeabilität haben, in großem Maße dem Metabolismus unterliegen. Die Einteilung in 4 Klassen bleibt bestehen, wobei die Permeabilität durch Metabolisierung ersetzt wird.

1.3 Standard Freisetzungsapparate

Die Europäische und die US Amerikanische Pharmacopoe (European Pharmacopoeia 2010; FDA 1997b) beschreiben für feste orale Darreichungsformen verschiedene Dissolutionsapparaturen. Diese werden je nach untersuchter Arzneiform eingesetzt.

- Rotating Basket: Kapseln und Tabletten, die zum Aufschwimmen neigen
- Paddle: Unproblematische Tabletten
- „reciprocating cylinder“ (bzw. Biodiss): Nicht zerfallende Tabletten; ermöglicht Wechsel des Mediums im Laufe des Versuchs
- Durchflusszelle: Alle Arten von peroralen Arzneiformen und Zäpfchen; ermöglicht Wechsel des Mediums im Laufe des Versuchs

Auch die Anforderungen an die Gefäße und die gängigen Puffer werden dort beschrieben. Allerdings können auch andere Dissolutionsmedien verwendet werden. Die Anforderungen der FDA (FDA 1997b) erlauben, dass jede Methode, deren Einsatz rational zu begründen ist, deren Spezifikationen eine Diskriminierung unterschiedlicher Chargen möglich macht und deren Ergebnisse reproduzierbar sind, registrierbar ist. Somit ist einer Weiterentwicklung der Freisetzungsapparaturen von regulatorischer Seite keine Grenze gesetzt. Neuartige Modelle, die das Freisetzungsverhalten der untersuchten Substanzen besser beschreiben, sind insofern nötig, als bei den bisher üblichen Dissolutionsanlagen, bedingt durch ihren Aufbau und ihre Limitationen, eine Anpassung an die Verhältnisse im Körper nur schwer möglich ist. Allerdings müssen die entwickelten Methoden, um den Ansprüchen einer Zulassungsbehörde zu genügen, stets validiert werden, was mit einem enormen Aufwand verbunden ist.

1.4 In vivo/in vitro Korrelation (IVIVC)

Die rechtlich geltende Grundlage für die IVIVC bilden die Guidances der FDA (FDA 1997a; FDA 1997c). Darin definiert die FDA den Begriff „IVIVC“ wie folgt: „IVIVC ist ein prädikatives mathematisches Modell, das die Relation zwischen in vitro Eigenschaften einer Arzneiform und einer entsprechenden in vivo Antwort beschreibt. Im Allgemeinen wird in vitro Geschwindigkeit oder Ausmaß von Dissolution oder Freisetzung beobachtet, während in vivo die Plasmakonzentration oder die absorbierte Wirkstoffmenge untersucht wird“.

In diesen Guidances wird der regulatorische Rahmen abgesteckt, in dem eine IVIVC eingesetzt werden kann. Das Ziel einer Freisetzungsmethode, mit der die IVIVC gelingt, ist es zu zeigen, dass Änderungen an der Formulierung oder der Herstellung keinen Einfluss auf die in vivo Performance der Arzneiform haben. Allerdings kann eine IVIVC nur für Formulierungen mit modifizierter Wirkstofffreisetzung zugelassen werden. Falls für eine modified release Formulierung keine IVIVC registriert ist, müssen ab einem bestimmten Grad an Abweichung Bioäquivalenzstudien durchgeführt werden. Die Erlaubnis zum Verzicht auf solche Studien zugunsten der Durchführung von in vitro Tests wird mit dem Begriff „Biowaiver“ belegt (FDA 1997c).

Allerdings kann eine IVIVC auch ohne die Registrierung der Methode nützlich sein. Während der Entwicklung von Formulierungen kann durch biorelevante Freisetzungsmethoden zum Beispiel eine Auswahl der Prototypen getroffen werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit bei Studien am Menschen die erwarteten und gewünschten Plasmaspiegelkurven generieren.

1.4.1 Charakterisierung von Formulierungen

Arzneiformen mit modifizierter Wirkstofffreisetzung sind in ihrem Formulierungsansatz oft sehr komplex. Dieser Umstand macht die Erstellung einer IVIVC zu einem aufwändigen Unterfangen. Um die Arzneiform in ihrer Gänze verstehen zu können, müssen sowohl Wirkstoff als auch Formulierung detailliert betrachtet werden. Zu den Daten, die Arzneistoff und -form charakterisieren gehören (Skelly et al. 1990):

- Die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Wirkstoffs wie z.B. pK_s -Werte, Löslichkeiten unter verschiedenen Bedingungen (pH-Werte, Lösungsmittel), Stabilität in verschiedenen Milieus, intrinsische Dissolution, BCS-Klassifizierung.
- Eine pharmakokinetische Charakterisierung des Wirkstoffs. Diese besteht aus der Bestimmung der Inputfunktion, also dem Verlauf der Absorption aus der Arzneiform. Dabei wird aus der Plasmaspiegelkurve der Verlauf der Elimination durch z.B. numerische Dekonvolution herausgerechnet (Cutler 1978a; Cutler 1978b). Bei modified release Formulierungen ist es sinnvoll die Resorption in verschiedenen Abschnitten des

gastrointestinalen Traktes zu bestimmen. Eine Möglichkeit dafür ist der Einsatz einer Hochfrequenzkapsel, die es erlaubt, ferngesteuert Wirkstoff zu bestimmten Zeiten oder an bestimmten Orten im gastrointestinalen Trakt freizusetzen (Staib et al. 1986).

- Die Eliminationskonstante. Diese wird optimalerweise durch eine i.v.-Injektion mit anschließender Messung der Plasmaspiegel bestimmt. Die Elimination kann auch durch Gabe einer Trinklösung oder einer immediate release-Formulierung bestimmt werden (Chan et al. 1987).
- Die Dispositionsphase. Dazu gehören Faktoren wie Clearance, Verteilungsvolumen, Halbwertszeiten, mittlere Absorptionsdauer (MAT), mittlere Verweildauer (MRT) und Akkumulation bei Mehrfachdosierung. Außerdem sollten Untersuchungen zu Metabolismus (Enzyme, Produkte, aktive Metaboliten, Ausscheidungsorgan), zu enterohepatischem Kreislauf und first-pass Effekt angestellt werden. Variationen in der Disposition, die durch Alter, Geschlecht oder Rasse entstehen, müssen ebenso berücksichtigt werden. Der Einfluss der einzelnen Faktoren auf den gesamten LADME-Prozess (Liberation, Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination) sollte möglichst ausführlich untersucht werden, um für später auftretende Änderungen plausible Erklärungen zu finden ohne neue Studien durchführen zu müssen.
- Eine Untersuchung der pharmakodynamischen Parameter wie Dosis-Wirkungs-Beziehungen über einen weiten Dosisbereich und die Entstehung von wirksamen Metaboliten und deren Eigenschaften.
- Die Formulierung als solche. Also Angaben zu den Bestandteilen, ihrem Mengenanteil und ihrer Funktion in der Rezeptur sowie Dissolutionsprofile bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich zur Dissolution der reinen Substanz.
- Prozessparameter wie verwendete Apparate, angelegte Presskräfte und die Inprozesskontrollen. Außerdem die dadurch resultierenden Abriebfestigkeiten, Bruchfestigkeiten und Zerfallszeiten.
- Außerdem die PK-Studien, die mit der Formulierung durchgeführt wurden. Dabei sollte die Formulierung mit anderen Formulierungen und Wirkstärken verglichen worden sein. Interessante Parameter hierbei sind AUC, mittlere Dissolutionszeit (MDT), C_{max} und T_{max} .

1.4.2 Erstellen einer IVIVC

Jeder gut durchdachte Ansatz, der eine hohe Vorhersagekraft hat, ist geeignet eine IVIVC zu etablieren (Gido et al. 1994). Die Entwicklung einer IVIVC jedoch ist ein dynamischer Prozess, der in der Entwicklung eines Arzneistoffs von Anfang an berücksichtigt werden und Eingang finden sollte (Marroum 2007). Eine gefundene IVIVC bietet ein enormes Einsparpotential. Schon ein qualitatives Ranking der Formulierungen während der Formulierungsentwicklung spart bis zur Marktreife permanent Geld ein. Ein solches Ranking ist zwar für Zulassungszwecke unzureichend, allerdings gelingt es mit einem guten in vitro Modell schon früh, Formulierungsansätze zu erkennen, deren Performance nicht den Erwartungen entspricht und diese aus der Entwicklung auszuschließen. Während der Entwicklung eines Prototyps kann von den ersten Formulierungsentwürfen an dem Konzept der IVIVC gearbeitet werden.

Um die IVIVC zu beweisen, werden Dissolutionsdaten mit Plasmaspiegelkurven verglichen (FDA 1997a). Dabei wird die absorbierte Fraktion (F_a) in vivo gegen die freigesetzte Fraktion (F_d) in vitro aufgetragen. Im optimalen Fall ergibt dieser so genannte Levy-Plot, eventuell unter Einberechnung von Faktoren, eine Gerade mit der Steigung eins. Das bedeutet, die Kurven sind deckungsgleich („superimposable“). Ein solcher Zusammenhang ist typisch für eine Level A-Korrelation.

Sollte die Verwendung eines Faktors nötig werden, muss dieser für alle Formulierungen und Freisetzungsmidien identisch sein. Ein solcher Faktor kann zum Beispiel angewendet werden, um eine lag-Phase am Anfang der Plasmaspiegelkurve rechnerisch zu eliminieren. Ein weiterer Faktor kann zur Skalierung der Zeit-Achse der in vivo Daten eingeführt werden. Dadurch wird die Abbildung von Plasmaspiegelkurven, welche über mehrere Tage hinweg erhoben wurden, durch vergleichsweise kurze in vitro Experimente möglich.

Für die Erstellung einer IVIVC sollten mindestens zwei unterschiedliche schnell freisetzende Formulierungen in vivo und in vitro miteinander verglichen werden. Für die in vivo Studie sollte außerdem eine Referenzformulierung eingesetzt werden, bei der die Dissolution keinen oder nur sehr wenig Einfluss auf die Bioverfügbarkeit hat (i.v.-Injektion, Trinklösung, schnell freisetzende Tablette). Die in vitro Methode muss, nachdem sie entwickelt und validiert wurde, für alle Formulierungen angewendet werden. Nach Möglichkeit werden wässrige Lösungen mit einem pH-Wert von maximal 6,8 verwendet.

Nach der Zulassung einer IVIVC, genügt es die Dissolutionsprofile der neuen Formulierung, die den gleichen Freisetzungsmechanismus haben muss, mit dem der alten Formulierung zu vergleichen. Dazu wird der f_2 -Test verwendet (FDA 1997c; Moore et al. 1996). Die Dissolutionsprofile gelten als gleichwertig, wenn der modifizierte f_2 -Test (=similarity factor) ein Ergebnis zwischen 50 und 100 ergibt. Solche Werte bedeuten, dass sich die Graphen in jedem Punkt um weniger als 10 % unterscheiden (Shah et al. 1998). Je näher sich der Wert 100 nähert, desto ähnlicher sind die Profile (Gleichung 1-7).

$$f_{2,10} = 50 * \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{P} \right) * \sum_{i=1}^P (\mu_{ti} - \mu_{ri})^2 \right]^{-0,5} * 100 \right\}$$

Gleichung 1-7: f_2 -Test auf Ähnlichkeit zweier Dissolutionsprofile

P: Zahl der Messpunkte (Messzeiten)

$\mu_{ri} - \mu_{ti}$: Abstand zwischen dem Referenzprofil (r) und dem Testprofil (t)

1.4.3 Korrelationsstufen im Rahmen einer IVIVC

Je nachdem, wie gut die Freisetzungskurve die Absorptionskurve abbildet und sich ihr annähert, bzw. je nachdem, welche Zusammenhänge zwischen Freisetzung und absorbierter Fraktion sich ergeben, werden unterschiedliche Korrelationsstufen erreicht.

1.4.3.1 Level A-Korrelation

Eine Level A-Korrelation liegt vor, wenn die in vitro Freisetzungskurve die in vivo Plasmaspiegel punktgenau abbildet. Normalerweise liegt ein linearer Zusammenhang vor, allerdings werden auch nicht lineare Beziehungen akzeptiert. Zur Berechnung der absorbierten Fraktion in vivo können Näherungen wie z.B. Wagner-Nelson für 1-Kompartiment-Modelle und Loo-Riegelman für 2-Kompartiment-Modelle (Wagner 1974; Wagner 1975) herangezogen werden. Diese Näherungen und Rechenmodelle erlauben es, die Elimination des Wirkstoffs aus dem Körper aus dem Gesamtprozess herauszurechnen. Die genaueste Methode, da sie von einem systemischen und nicht von einem kompartmentellen Ansatz ausgeht, ist die numerische Dekonvolution. Diese wird in Abschnitt 1.5.4 ausführlicher erklärt.

Gelangt man zu einer A-Korrelation, ist es möglich Bioäquivalenz bei späteren Änderungen an Formulierung, Herstellung oder Dosis durch reine in vitro Testung zu beweisen.

1.4.3.2 Level B-Korrelation

Bei dieser Korrelationsstufe wird die statistische Momentanalyse verwendet um zu einer IVIVC zu gelangen. Als in vitro Parameter wird die mittlere Dissolutionszeit (MDT_{vitro}) entweder mit der MDT_{vivo} oder der mittleren Verweildauer (MRT_{GIT}) in vivo verglichen. Die Berechnung der jeweiligen Parameter wurde in Kapitel 1.2 vorgestellt. Eine solche Korrelation verwendet zwar alle Punkte der Dissolutionskurve, kann jedoch trotzdem nicht als 1:1-Abbildung der in vivo Verhältnisse angesehen werden, da verschiedene in vitro und in vivo Profile die gleichen Dissolutionszeiten oder Verweildauern ergeben können.

1.4.3.3 Level C-Korrelation

Für eine Level C-Korrelation wird ein Punkt im Freisetzungsprofil (z.B. $t_{50\%}$, $t_{90\%}$) mit einem pharmakokinetischen Parameter (AUC , C_{max} , t_{max}) in Bezug gesetzt. Das heißt, dass nur ein Punkt der Kurven repräsentiert wird. Daher ist diese Korrelationsstufe auch die schwächste und besitzt nur wenig Prädiktionskraft für regulatorische Zwecke. Diese Stufe an Korrelation findet daher auch eher Anwendung in der Auswahl möglicher Formulierungen.

1.4.3.4 Multiple-Level C-Korrelation

Für eine Multi-C-Korrelation stellt sich die Verwendbarkeit anders dar. Hier werden verschiedene pharmakokinetische Parameter mit verschiedenen Punkten der Freisetzungskurve in Relation gesetzt. Dieser Level erlaubt, im Gegensatz zur einfachen Level C-Korrelation, die Anwendung bei der Zulassung von Formulierung und Freisetzungsmethode und dem Gewähren von Biowaivern. Multiple C-Korrelationen sollten zu diesem Zweck an mindestens drei Parametern durchgeführt werden.

Allerdings kann, wenn eine Multiple-Level C-Korrelation gelingt, davon ausgegangen werden, dass auch eine A-Korrelation möglich ist.

1.4.3.5 Level D-Korrelation

Diese Korrelationsstufe ermöglicht eine qualitative Rangordnung innerhalb der Formulierungen. Es wird keine formale Korrelation durch Rechenoperationen durchgeführt, sie kann lediglich als Werkzeug in der Verfahrensentwicklung dienen (Sirisuth et al. 2002).

1.4.4 Umwandlung der Plasmaspiegeldaten durch numerische Dekonvolution

Durch die Verfügbarkeit von Software, in der Tools zur numerischen Dekonvolution angeboten werden (z.B. WinNonline von Pharsight), hat sich diese Möglichkeit der Gewinnung von kumulierten Absorptionskurven aus Plasmaspiegelkurven mittlerweile als Werkzeug bei IVIVC-Studien durchgesetzt (Cao et al. 2008; Larsen et al. 2002; Parojcic et al. 2005; Pedersen 1981). Im Gegensatz zu den in Abschnitt 1.4.1 aufgezählten kompartmentellen Möglichkeiten, wird der Körper bei der numerischen Dekonvolution als lineares System betrachtet (Langenbucher 1982b). Die Aufnahme und das Schicksal des Arzneistoffs werden darin durch drei Funktionen beschrieben:

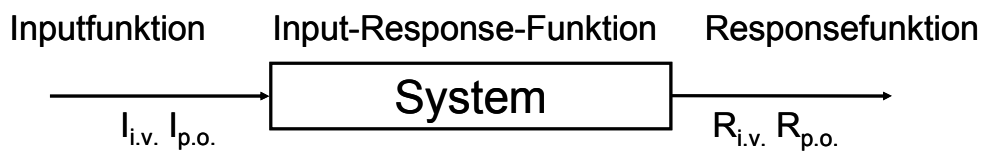


Abbildung 1-4: Beschreibung des Körpers bei der numerischen Dekonvolution

Durch Kenntnis von zwei dieser drei Funktionen kann die jeweils dritte berechnet werden. Die Inputfunktion beschreibt die Aufnahme des Stoffs aus der Arzneiform, die im normalen Fall auch der in vivo Dissolution entspricht. Durch die Input-Response-Funktion bzw. Unit-Impuls-Response (UIR) oder Gewichtsfunktion wird die Dispositionsphase des Arzneistoffs abgebildet. In der Dispositionsphase sind Prozesse wie Verteilung, Metabolismus und Elimination enthalten. Die Responsefunktion entspricht der Plasmaspiegelkurve, die man nach Applikation eines Arzneistoffs durch Messung der Konzentrationen im Blut des Probanden erhält. Das Verfahren, mit dem aus bekanntem Freisetzungsprofil und Kenntnis der Impuls-Antwort die Antwortfunktion berechnet wird, wird als Konvolution (= Faltung) bezeichnet. Dekonvolution (= Entfaltung) ist dementsprechend das umgekehrte Verfahren, bei dem Responsefunktion und Gewichtsfunktion miteinander verrechnet werden, um zur Inputfunktion der Formulierung zu gelangen. Diese Zusammenhänge zwischen den drei Funktionen sind in Abbildung 1-5 dargestellt.

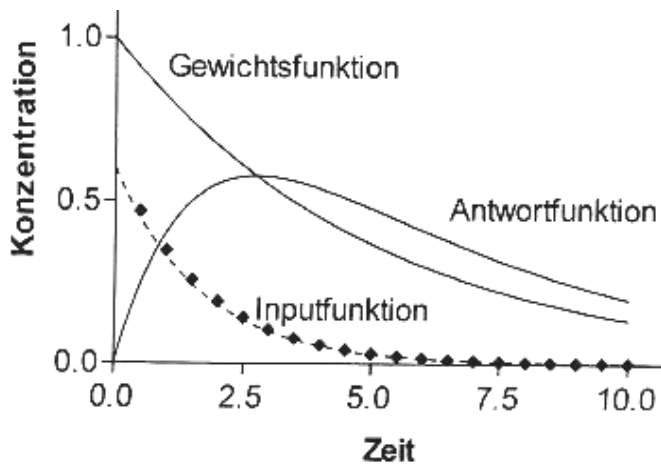


Abbildung 1-5: Zusammenhang zwischen Input-, Gewichts- und Antwortfunktion

Nach Langenbucher lässt sich das Konzentrations-Zeitprofil $c_{po}(t)$ bei Einnahme einer oralen Formulierung wie folgt beschreiben (Langenbucher 1982a):

$$c_{po}(t) = \mu(t) \cdot \alpha'(t) = \int_0^t \mu(t-u) \cdot \alpha'(u) du = \int_0^t \mu(t-u) d\alpha(u)$$

Gleichung 1-8: Konzentrations-Zeit-Profil nach peroraler Applikation

$c_{po}(t)$ Response-Funktion

$\alpha(t)$ Wirkstofffreisetzung (kumuliert) = Input-Funktion

$\mu(t)$ Wirkstoffelimination = Impuls-Response

$\alpha'(t)$ Ableitung von $\alpha(t)$ nach der Zeit

Zur Berechnung der Gewichtsfunktion ist die intravenöse (i.v.) Applikation am besten geeignet, da bei dieser Art der Arzneimittelgabe keine Freisetzung oder Absorption des Wirkstoffs in die Antwortfunktion eingeht. Das bedeutet, dass im Falle einer i.v.-Gabe die Responsefunktion der Gewichtsfunktion entspricht. Weniger genau ist die Bestimmung der Input-Response-Funktion nach Aufnahme des Wirkstoffs aus einer Trinklösung (Chan et al. 1987), da in die Responsefunktion auch die Absorption des Wirkstoffs im gastrointestinalen Trakt eingeht.

Die einfachste Lösung des oben erklärten Systems bietet die so genannte Bateman-Funktion (Gleichung 1-10; Koehne-Voss 2006). Bei dieser wird davon ausgegangen, dass alle Prozesse, die das Schicksal der Formulierung im Körper betreffen, nach einer Reaktionskinetik erster Ordnung ablaufen (Gleichung 1-9).

$$c(t) = c(0) \cdot e^{-k \cdot t}$$

Gleichung 1-9: Reaktion erster Ordnung

$c(t)$ bzw. $c(0)$ Konzentration zum Zeitpunkt t bzw. bei $t=0$

k Konstante

Dementsprechend ergibt sich bei Anwendung von Gleichung 1-8 folgende Gleichung für die Response-Funktion:

$$\begin{aligned} c_{po}(t) &= \int_0^t \frac{D}{V} \cdot e^{-k_e \cdot (t-u)} \cdot k_a \cdot e^{-k_a \cdot u} \, du \\ &= \frac{D \cdot k_a}{V} \cdot e^{-k_e \cdot t} \cdot \int_0^t e^{(k_e - k_a) \cdot u} \, du \\ &= \frac{D \cdot k_a}{V} \cdot e^{-k_e \cdot t} \cdot \frac{1}{k_e - k_a} \cdot (e^{(k_e - k_a) \cdot t} - 1) \\ &= \frac{D}{V} \frac{k_a}{k_e - k_a} \cdot (e^{-k_a \cdot t} - e^{-k_e \cdot t}) \end{aligned}$$

Gleichung 1-10: Bateman-Funktion

D Dosis

V Verteilungsvolumen

k_a Absorptionskonstante

k_e Eliminationskonstante

1.5 Möglichkeiten die Biorelevanz bei in vitro Versuchen zu erhöhen

Im Lauf der letzten Jahre befassen sich immer mehr Arbeitskreise mit der Erhöhung der Biorelevanz. So wird gesteigerte Biorelevanz zum Beispiel dadurch erreicht, dass das Freisetzungsvolumen auf 500 bzw. 250 ml begrenzt wird (Dressman et al. 2000; Nicolaidis et al. 1999). Dadurch wird es der Flüssigkeitsmenge angepasst, die bei der Einnahme einer Tablette zugeführt wird. Weiterhin kann durch Annäherung der Freisetzungsmethoden an die Zusammensetzung der gastrointestinalen Puffersysteme eine bessere Korrelation zwischen in vivo und in vitro Daten erreicht werden (Galia et al. 1998). Durch Änderung des pH-Wertes im Verlauf eines Dissolutionsversuches wird versucht, die Darmpassage zu simulieren. Dies ist durch Einsatz der Dissolutions-Apparaturen 3 und 4 des Europäischen Arzneibuches möglich (Abschnitt 1.3).

Auch durch Freisetzungsmodelle, bei denen der Wirkstoff aus dem Freisetzungskompartiment entfernt wird (Grundy et al. 1997a; Venema et al. 2000), wird die in vivo Situation besser abgebildet, als dies durch die Standard-Modelle der Arzneibücher möglich ist. Anlagen, in denen Freisetzung und Permeation durch Caco-2-Zellen simultan untersucht werden können, können die Aussagekraft von Caco-2-Experimenten nochmals erhöhen (siehe Abschnitte 1.7; Buch et al. 2009).

In den folgenden Abschnitten wird auf die aufgezählten Möglichkeiten ausführlicher eingegangen.

1.5.1 Verwendung simulierter intestinaler Flüssigkeiten

Einer der Vorteile der simulierten intestinalen Flüssigkeiten (SIFs) ist deren Verwendbarkeit in Standard-Freisetzungssystemen. Beim Einsatz der SIFs werden Substanzen, die auch im menschlichen Intestinum vorkommen, zu Freisetzungsmethoden zugefügt. Im Laufe der letzten Jahre sind verschiedene Medien eingeführt worden, die den Darmsaft zu unterschiedlichen Situationen (nüchtern bzw. postprandial) simulieren sollen. Beispiele für diese Puffer sind Fasted State SIF (FaSSIF) und Fed State SIF (FeSSIF) (Dressman et al. 1998a), Human Intestinal Fluid (fed HIF) (Persson et al. 2005) oder Simulated Endogenous Intestinal Fluid (SEIF) (Kossena et al. 2004).

Durch den Einsatz von (unter anderem) Taurocholat und Phosphatidylcholin, wird bei diesen simulierten intestinalen Flüssigkeiten eine Anpassung der in vitro Bedingungen an die in vivo Freisetzungssituation erreicht. Eine weitere Anpassung geschieht durch die Angleichung von Osmolalität, Oberflächenspannung, Pufferkapazität und pH-Wert an die in vivo Verhältnisse. Unterschiede zum Darmsaft bestehen jedoch in der Auswahl der zugrunde liegenden Puffer-

systeme. Während im Menschen Bicarbonat-Puffer vorkommen, wird bei den SIFs mit Phosphat-Puffern oder Acetat- bzw. Citrat-Puffern gearbeitet. Der Versuch der Verwendung eines Bicarbonatpuffers für in vitro Experimente ist jedoch nicht gelungen (Boni et al. 2007).

1.5.2 Entfernung des Wirkstoffs aus dem Freisetzungskompartiment

Die in den Arzneibüchern beschriebenen Freisetzungsanlagen sind in Abschnitt 1.3 erläutert. Sobald in diesen eine Substanz ihre Sättigungslöslichkeit erreicht hat, kann kein weiterer Wirkstoff aus der zu untersuchenden Arzneiform freigesetzt werden. Um dies zu umgehen, wurden in den letzten Jahren mehrere Möglichkeiten entwickelt, die den Wirkstoff nach seiner Freisetzung aus dem Freisetzungskompartiment entfernen.

Eine dieser Möglichkeiten ist der Einsatz einer lipophilen Phase über dem normalen Freisetzungskompartiment, in welche der Wirkstoff, abhängig von seiner Lipophilie, diffundiert (Grundy et al. 1997b; Pillay et al. 1999). Die organische Phase wird bei diesen Modellen durch n-Octanol gebildet. Der Einsatz dieses aliphatischen Alkohols bietet sich wegen seiner äußerst geringen Mischbarkeit mit Wasser und den resultierenden Diffusionsgeschwindigkeiten, die denen menschlicher Epithelien ähneln, an (Smith et al. 1975).

Apparativ deutlich aufwändiger ist das von Kostewicz et al. entwickelte Transfermodell (Kostewicz et al. 2003). Hier wird die Arzneiform in saurem Puffer freigesetzt und das Freisetzungskompartiment sukzessive in ein weiteres, mit neutralem Puffer befülltes Gefäß überführt. Durch die pH-Anhebung kommt es bei schwachen Basen, für die das Modell entwickelt wurde, zu einer Präzipitation des Wirkstoffs. Das Auflösungsverhalten des Präzipitats wird ebenso untersucht, wie die Freisetzung des Wirkstoffs im Sauren. Allerdings verbleibt der gelöste Wirkstoff im zweiten Kompartiment der Anlage und erreicht dort seine Sättigungslöslichkeit.

Das höchste Maß an Biorelevanz erzielt das „TNO gastrointestinal Model“ (TIM) von TNO (Larsson et al. 1997). Das Modell besteht aus mehreren hintereinander geschalteten Glaskörpern, in denen durch einen eingesetzten Schlauch die Peristaltik simuliert werden kann. Jeder dieser Glaskörper entspricht einem Kompartiment des gastrointestinalen Trakts und wird dementsprechend auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt. Zu bestimmten Zeiten wird ein Aliquot des Freisetzungsmediums des jeweiligen Kompartiments in das nächste überführt, wodurch der Transit der Arzneiform simuliert und ermöglicht wird. Der Wirkstoff wird kontinuierlich durch Dialysemodule entfernt. Zur weiteren Annäherung an die in vivo Verhältnisse werden den jeweiligen Abschnitten Pufferkomponenten, die den Bestandteilen des Darmsaftes entsprechen, zugesetzt. Dies sind neben den Substanzen, die sich auch in den simulierten intestinalen Medien finden, Enzyme, welche die Verdauung bzw. den Abbau von Wirkstoffen im intestinalen Trakt simulieren sollen. Durch diesen Aufbau wird der menschl-

che Verdauungsapparat also nahezu vollständig simuliert. Allerdings ist der Betrieb zu aufwändig, um zur Routinetestung von Wirkstoffen bzw. den entsprechenden Formulierungen herangezogen zu werden.

1.6 Caco-2-Zellen

Zellmodelle haben gegenüber Tierversuchen den Vorteil, dass sie weniger aufwändig sind als diese und sie, begründet durch ihre ausreichend hohe Vorhersagegenauigkeit, zum Teil ersetzen können. Außerdem wird mit menschlichem Gewebe gearbeitet, was die in vivo/in vitro Korrelation verbessern kann.

1.6.1 Herkunft und Allgemeines

Die Zellen, aus denen die Caco-2-Zellen kultiviert wurden, wurden 1974 einem 72-jährigen Patienten mit primärem Kolonadenokarzinom entnommen (Fogh et al. 1977). Nach der Aussaat dauert es ungefähr 9 Tage, bis die Zellen zu einem konfluenten Monolayer proliferieren (Abbildung 1-8) und danach spontan zu polaren Zellen ausdifferenzieren (Chantret et al. 1988). Sie entwickeln sich zu einem Gewebe, das in den wichtigsten Eigenschaften (Morphologie, Transporter- und Enzymausstattung und Permeabilität) den Zellen des Intestinums sehr ähnlich ist. Nach der Differenzierung zeigen Caco-2-Zellen die für Zellen des Darmepithels typische Polarisation mit apikalem Bürstensaum aus Mikrovilli, Bildung von Bürstensaumenzymen und -transportern und die Ausbildung von tight-junctions (Shah et al. 2006).

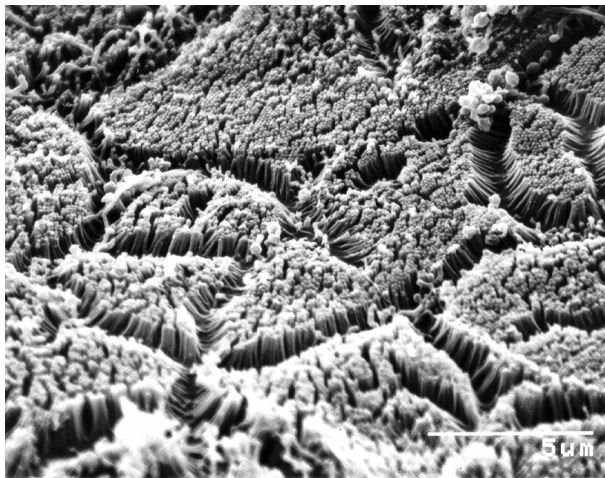


Abbildung 1-6: Konfluenten Caco-2-Monolayer

Das Caco-2-Modell ist heute weit verbreitet und findet vor allem bei der Erforschung von neuen Arzneistoffen und der Aufklärung von Transportmechanismen Anwendung. Der Grund für den breiten Einsatz des Modells ist, dass für passiv transzellulär transportierte Arzneistoffe eine gute Korrelation zwischen in vivo Versuchen und Caco-2-Zellversuchen besteht (Artursson et al. 1993).

Trotz der weltweiten Anerkennung des Caco-2-Modells gibt es noch immer Verbesserungen im Protokoll zur Durchführung der Versuche, die vor allem die Vorhersagegenauigkeit erhöhen sollen. So hat die Einführung eines pH-Gradienten von apikal 6,8 zu basolateral 7,4 die Übertragbarkeit der Caco-2-Daten auf die in vivo Situation enorm verbessert (Sun et al. 2004). Gegenüber Modellen ohne biologische Komponente haben Caco-2-Zellen den Vorteil, dass sie nicht nur passive Diffusion, sondern auch aktive Mechanismen des Transports berücksichtigen und so mehr Faktoren als nur Lipophilie und Dissoziationsgrad in das Modell eingehen (Artursson 1991; Hidalgo et al. 1989).

Neben vielen Transportern, die zur Aufnahme von Nahrungsbestandteilen und Arzneistoffen dienen (Le Ferrec et al. 2001), bilden Caco-2-Zellen das permeability glycoprotein (P-gp) aus. P-gp ist ein aktiver, membrangebundener Transporter, der vor allem für den Efflux von Stoffen aus den Zellen ins apikale Kompartiment zuständig ist und demzufolge vor allem an der apikalen Membran zu finden ist. Die Funktion von P-gp ist an die ATP-Hydrolyse gebunden, läuft also unter Energieverbrauch ab (Sakaeda 2005). P-gp ist insofern wichtig, als dass der Transporter bei vielen Wirkstoffen dafür verantwortlich ist, dass keine ausreichend hohen Blutspiegel generiert werden können. Es übt dementsprechend eine Barrierefunktion aus, die verhindern kann, dass Arzneistoffe in den Körper gelangen (Loo et al. 2004).

1.6.2 Einfluss von Hilfsstoffen auf die Permeabilität

In dieser Arbeit werden Caco-2-Zellen unter anderem dafür verwendet, die Einflüsse verschiedener Hilfsstoffe, die für orale Darreichungsformen eingesetzt werden, aufzuklären. Die meisten Untersuchungen zum Einfluss von Hilfsstoffen auf die Caco-2-Permeabilität wurden mit Hilfsstoffen gemacht, die bei problematischen Wirkstoffen entweder die Löslichkeit, die Absorption oder Beides steigern sollen. Bisher gibt es jedoch keine Untersuchungen, die normale Hilfsstoffe wie Bindemittel, Sprengmittel etc., untersuchen und deren Einfluss charakterisieren.

Bei Untersuchungen zu Hilfsstoffeffekten auf die Absorption müssen jedoch die Unterschiede zwischen dem Caco-Modell und dem Darmepithel im menschlichen Intestinum bedacht werden. So werden Caco-2-Monolayer beispielsweise nicht durch einen Mucuslayer geschützt. Somit gelangen sie in direkten Kontakt mit jedem Hilfsstoff, der in der Untersuchungslösung vorhanden ist. Weiterhin besitzen die Zellen keine Möglichkeit zur Regeneration nach Schädigung durch die Versuchsparameter oder die untersuchten Stoffe. Durch die hohe Aktivität des Darmepithels ist die Regeneration der Mucosa in vivo jedoch ein schnell ablaufender Prozess. Außerdem liegt die Expositionsdauer, bedingt durch die begrenzte Oberfläche bzw. das Fehlen des Weitertransports der Untersuchungslösung, deutlich über derjenigen, die in vivo zu erwarten ist. Ein weiteres Problem bei der Untersuchung von Hilfsstoffeffekten,

die auf ionischen Wechselwirkungen beruhen, ist, dass die gefundenen Effekte im menschlichen gastrointestinalen Trakt mit nur geringer Wahrscheinlichkeit zu erwarten sind, da die Ionenmenge in vivo um ein Vielfaches höher und dadurch praktisch nicht zu beeinflussen ist.

Aus diesen Gründen muss schon vor Versuchen stets Augenmerk auf die Biorelevanz gelegt werden. Nur durch biorelevantes Versuchsdesign kann gezeigt werden, in welchen Fällen eine echte Permeationsmodulation vorliegt und in welchen der Monolayer nur durch toxische Effekte geschädigt wird. Dementsprechend kann durch Versuche mit Caco-2-Zellen nur das Fehlen eines Effektes postuliert werden. Eine Umrechnung eines in vitro Effekts auf die Verhältnisse im menschlichen Körper ist wegen der genannten Unterschiede nur schwer bzw. gar nicht möglich.

In den folgenden Abschnitten werden die bisher beschriebenen Effekte aufgezählt und erläutert.

1.6.2.1 Modulation von tight-junctions

Tight-junctions sind Proteinkomplexe an der apikalen Membran zwischen den einzelnen Caco-2-Zellen und dichten diese gegen unkontrollierte Diffusion hydrophiler Substanzen ab (Hidalgo et al. 1996). Ihre Funktion ist an Calcium-Ionen gebunden, wodurch in Ca-freien Medien der Flux hydrophiler Stoffe deutlich ansteigt. Der gängige Indikator für die tight-junction Modulation ist der Flux von PEG 4000, welches im Caco-2-Modell auf Grund seiner Hydrophilie und Molekülgröße normalerweise nur äußerst geringer Permeation unterliegt.

Beispiele für Hilfsstoffe, die eine Modifikation der tight-junctions bewirken, sind:

- Na-Caprat
- Na-Laurylsulfat
- EDTA
- Crosscarmellose-Na
- Chitosan und seine Derivate

Während die tight-junctions bei Na-Laurylsulfat, EDTA und Crosscarmellose-Na durch Komplexierung des freien Calciums in ihrer Funktion gestört werden (Anderberg et al. 1993; Ginski et al. 1999b; Thanou et al. 2001), wird bei Anwesenheit von Na-Caprat freies Ca^{2+} im Zellinnern internalisiert (Anderberg et al. 1993; Aungst 2000). Bei den Chitosanen wird die tight-junction Integrität durch die Ladung der Chitosane gestört (Zerrouk et al. 2006).

1.6.2.2 *Interaktion mit der Zellmembran*

Weitere Möglichkeiten der Permeationsbeeinflussung durch Hilfsstoffe sind Interaktionen des Hilfsstoffs mit der Zellmembran. Inwiefern dieser Effekt *in vivo* eine Rolle spielt, ist fraglich, da die Zellen im Darm durch Mucus geschützt werden. Nachweisbar ist diese Art der Interaktion dadurch, dass bestimmte Enzyme oder Zellmembranlipide im Transportpuffer aufzufinden sind oder der Flux von Mannitol erhöht wird.

Beispiele für Hilfsstoffe, die die Permeation durch Interaktion mit der Zellmembran erhöhen:

- PEG-Esther, -Ether und -Sorbitan-Derivate
- Vitamin E TPGS
- Cyclodextrine
- Mittelkettige Triglyceride

Es werden zwei unterschiedliche Möglichkeiten der Interaktion mit der Membran der Epithelzellen beschrieben. Die aufgezählten PEG-Derivate und mittelkettige Triglyceride lösen die Membran der Zellen an bzw. auf (Anderberg et al. 1992; Raiman et al. 2003). Vitamin E TPGS und Cyclodextrine lagern sich in der Membran ein und erhöhen so deren Fluidität (Cano et al. 2005; Dintaman et al. 1999).

1.6.2.3 *Inhibition von P-gp*

Das P-gp (permeability glycoprotein) ist ein Transporter, der an der apikalen Membran von Permeabilitätsbarrieren zu finden ist. Es wurde im menschlichen Körper bisher an der Darmwand und der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen. Das P-gp kontrolliert die Absorption von Arzneistoffen, indem es Moleküle, die in das Innere der Zellen gelangt sind, unter Energieverbrauch zurück in das apikale Kompartiment befördert.

Einige Arzneistoffe sind bekannt für ihre Fähigkeit den Effluxtransporter zu hemmen, unter ihnen Verapamil und Chinin (Balimane et al. 2004). Allerdings hat sich herausgestellt, dass auch Hilfsstoffe P-gp hemmen und so die Permeabilität des Darmepithels erhöhen können.

Beispiele für Hilfsstoffe deren Anwesenheit die Permeation von Arzneistoffen durch P-gp-Inhibition erhöhen können sind:

- Polysorbat 80 (PEG-Sorbitan-FS-Derivat) (Hugger et al. 2002a; Rege et al. 2001)
- Cremophor EL (ethoxyliertes Rizinusöl) (Hugger et al. 2002b; Rege et al. 2002)
- Vitamin E TPGS (Brouwers et al. 2006)

1.7 Kombinierte Systeme

Die kombinierte Untersuchung von sowohl Freisetzung eines Wirkstoffs als auch seiner Absorption erlaubt es bei relativ geringem Aufwand, viele nützliche Aussagen zu treffen. Man kann die Bioverfügbarkeit des reinen Stoffs abschätzen und gleichzeitig das Verhalten der Arzneiform in vivo durch geschicktes Versuchsdesign gut abbilden. Auch für die kombinierten Modelle wurde eine Erweiterung des Transportpuffers zu den simulierten intestinalen Puffersystemen unternommen.

In der Literatur sind verschiedene Systeme beschrieben, die zu unterschiedlichen Zwecken eingesetzt werden.

1.7.1 Statisches System

Beim statischen System wird der Zusammenhang zwischen Freisetzung und Absorption in zwei getrennt von einander ablaufenden Schritten durchgeführt:

In einer Freisetzungsapparatur wird der Wirkstoff aus der Arzneiform freigesetzt und es werden zu bestimmten Zeiten Proben gezogen. Diese Proben werden zum Teil zur quantitativen Bestimmung der Freisetzung herangezogen, zum anderen werden damit vorbereitete Caco-2-Monolayer inkubiert und der effektive Permeationskoeffizient bestimmt (Gleichung 2-5).

Dieser Aufbau wird bereits 1999 vorgestellt (Ginski et al. 1999a). Ziel der Arbeit ist es, eine Vorhersage über das in vivo Verhalten von Arzneistoffen bzw. -formen und die Abhängigkeiten der Absorption von Dissolutionsvorgängen zu finden.

Ihnen gelingt die Vorhersage des limitierenden Faktors des Gesamtprozesses durch Aufzeichnen des absorbierten Anteils (F_a) gegen den freigesetzten Anteil (F_d) (Abbildung 1-9). Ergibt der Plot eine Gerade, so ist die Freisetzung limitierend; im Falle eines umgedrehten L's wird der Gesamtprozess durch die Permeation limitiert; stellt sich der Plot als „Hockeyschläger“ dar, so haben beide Prozesse Einfluss auf den Gesamtprozess.

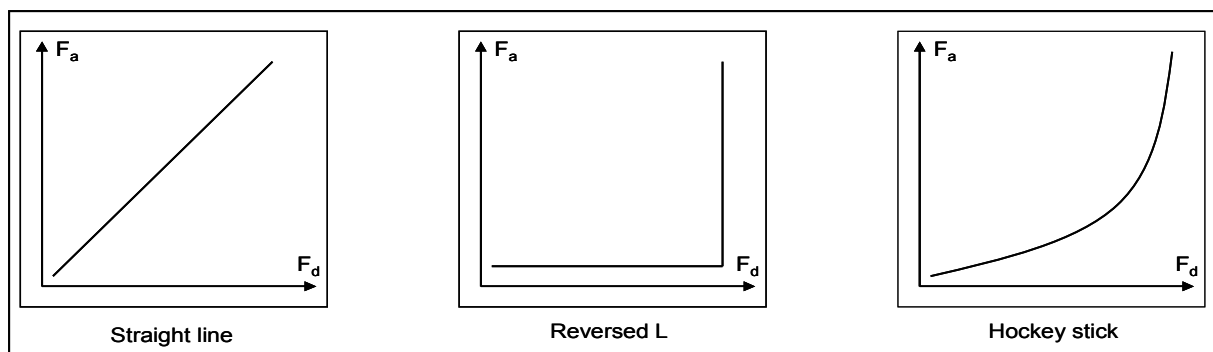


Abbildung 1-7: Mögliche F_a/F_d -Plots

Die oben genannten Plots können nach der folgenden Gleichung 1-11 gefittet werden, um die maximal absorbierbare Dosis (f_a) zu berechnen. Die Einschränkung bei der Anwendung der Formel liegt jedoch darin, dass beide Prozesse nach einer Kinetik erster Ordnung (Gleichung 1-9) ablaufen müssen.

$$F_a = \frac{1}{f_a} \left[1 - \frac{\alpha}{\alpha - 1} * (1 - F_d) + \frac{1}{\alpha - 1} * (1 - F_d) \right]$$

Gleichung 1-11: Berechnung des maximal absorbierten Anteils nach Ginski und Polli

- F_a im Experiment absorbierter Anteil zum Zeitpunkt t
- f_a absorbierter Anteil in vivo bei $t = \infty$
- α Quotient aus Permeationskonstante und Freisetzungsrate (beide nach Kinetik erster Ordnung)
- F_d im Experiment freigesetzter Anteil zum Zeitpunkt t

Das System ist in der Lage, zwischen immediate release und extended release Formulierungen zu unterscheiden und ermöglicht eine retrospektive Erklärung des Verhaltens von Arzneiformen, über die klinische Daten verfügbar sind. Allerdings gelingt es nicht, den F_a/F_d -Plot für die BCS 2-Substanz Piroxicam vorherzusagen, da wegen der größeren Oberfläche im menschlichen Intestinum die Löslichkeits- und Absorptionsverhältnisse in vitro nur unzureichend abgebildet werden konnten.

1.7.2 Dynamische Systeme

Der Nachteil des statischen, nicht kontinuierlichen Systems ist, dass die Absorptionszeit von der Dissolutionszeit entkoppelt ist (Ginski et al. 1999a). Das bedeutet, dass Proben aus dem Freisetzungskompartiment nur die reine Dissolution des Wirkstoffs beschreiben, ohne die parallel stattfindende Resorption des Stoffs wenigstens qualitativ abzubilden. Deswegen wird zur Integration beider Bestandteile ein dynamisches, kontinuierliches System entwickelt (Ginski et al. 1999b).

1.7.2.1 Das Modell von Ginski et. al.

Der Aufbau dieses ersten kombinierten, dynamischen Modells bietet die denkbar einfachste Konstruktion an (Ginski et al. 1999b). Es wird nur die apikale Seite umgepumpt, während das basolaterale Kompartiment keine Durchmischung erfährt.

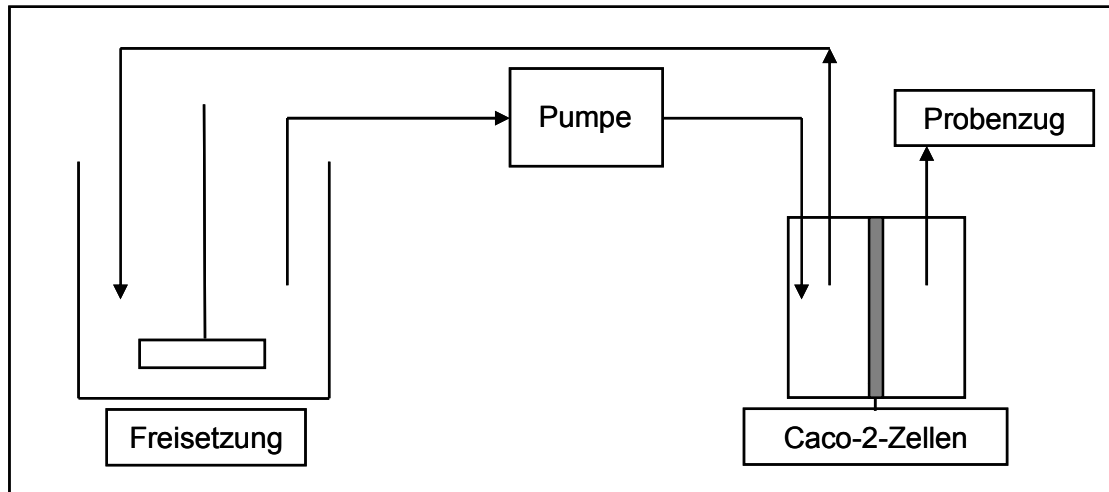


Abbildung 1-8: Kombiniertes Modell von Ginski

Ziele der Arbeit sind, neben Bau und Entwicklung der Apparatur, die Überprüfung der Ergebnisse aus dem statischen Modell. Weiterhin sollte der Einfluss von quervernetzter Carboxymethylcellulose auf sowohl Freisetzung als auch Absorption von Arzneistoffen untersucht werden.

Die Studie ergibt, dass der Effekt von Crosscarmellose-Na, der sich im Modell zeigt, in vivo nicht auftreten würde. Crosscarmellose-Na komplexiert in den Versuchen das freie Calcium, wodurch die tight-junctions durchlässiger für den untersuchten Arzneistoff (Ranitidin) werden. Da in vivo deutlich größere Mengen an Ca-Ionen vorliegen, wird postuliert, dass dieser Effekt im menschlichen Körper nicht zu erwarten sein dürfte.

Eine Schlussfolgerung dieser Ergebnisse ist, dass sich ein solches System eher dazu eignet, das Fehlen eines Hilfsstoffeffektes auf die Permeation zu zeigen. Das bedeutet, dass Effekte, wie sie in der Studie von Chen (Chen et al. 2007) auftreten, nicht mit einem Caco-Modell vorhergesagt werden können, da sie nicht in Permeationsmodulation begründet sind. In der Studie von Chen wird gezeigt, dass der Einsatz von Sorbitol als Hilfsstoff durch Verkürzung der intestinalen Passagezeit zur Reduzierung der Bioverfügbarkeit beitragen kann. Damit ist Chen einer der Ersten, der den Einfluss eines bisher als unbedenklich eingestuftem Arzneistoffs testet.

1.7.2.2 Das Modell von Miyazaki et al.

Miyazaki und seine Mitarbeiter entwickeln zur Untersuchung von pH-Effekten ein Modell, bei dem Freisetzung und Permeation bei zwei unterschiedlichen pH-Werten ablaufen können. Dazu wird in einer Durchflusszelle in saurem Medium freigesetzt. Das Freisetzungsmedium wird anschließend in einem größeren Gefäß neutralisiert. Die so auf einen pH-Wert von 6 eingestellte Lösung wird dann über den Caco-2-Monolayer gepumpt.

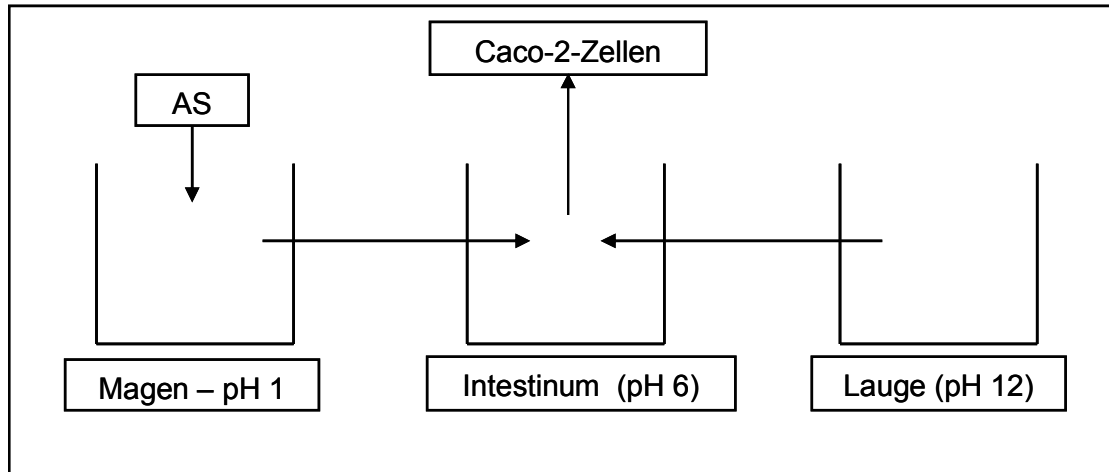


Abbildung 1-9: Kombiniertes Modell von Miyazaki

Der Arbeitsgruppe (He et al. 2003; He et al. 2004; Kobayashi et al. 2001; Sugawara et al. 2005) gelingt es, Effekte, die durch verschiedene pH-Werte in Magen und Darm erklärbar sind, im Modell nachzubilden. Ein Beispiel dafür ist das Auftreten von Wirkstoff-Präzipitat pH-abhängig löslicher Arzneistoffe. Durch die pH-Änderung gelingt es, das in vivo Verhalten schwer-wasserlöslicher Stoffe besser darzustellen, als es dem Modell von Ginski möglich ist.

Die Artikel der Gruppe zeigen auch, dass Versuche mit Caco-2-Zellen über einen Zeitraum von fünf Stunden durchführbar sind, ohne dass die Integrität des Monolayers abnimmt. Nachteil dieses halb-offenen bzw. offenen Systems ist jedoch, dass die Permeation nur in Abhängigkeit der Konzentration im Dissolutionsmedium zum Zeitpunkt t bestimmt werden kann.

1.7.2.3 Das Modell von Kataoka et al.

Die Arbeiten von Kataoka et al. beruhen auf einem geschlossenen System, das ohne Pumpen betrieben wird und vergleichbar ist mit der Ussing-Kammer. Weder Freisetzungsmedium noch basolaterales Kompartiment werden durch Pumpen bewegt. Beide Seiten befinden sich in gerührten Gefäßen, die über den Caco-2-Monolayer verbunden sind.

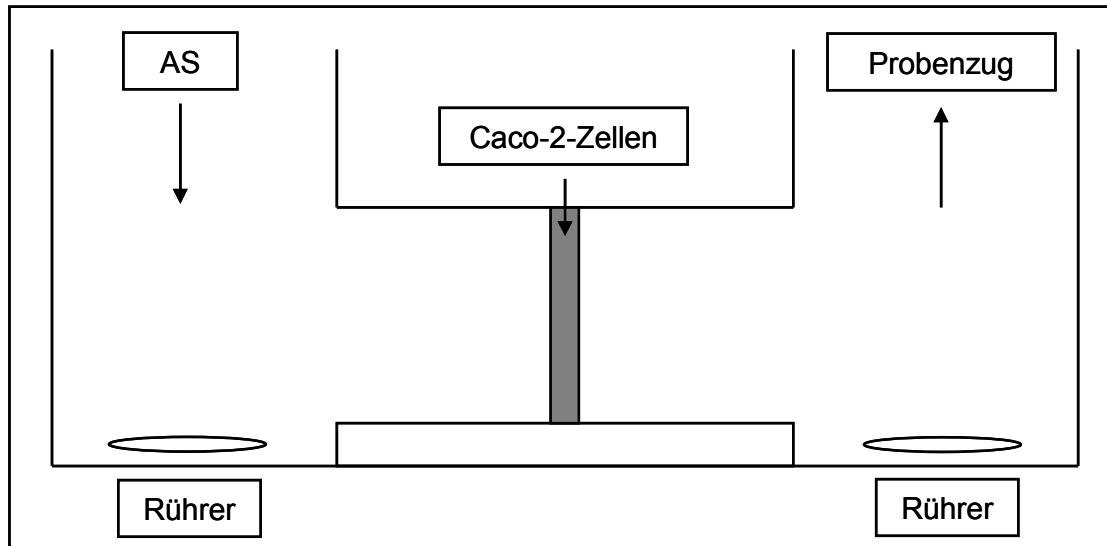


Abbildung 1-10: Kombiniertes Modell von Kataoka

Als Volumen der Kompartimente werden apikal 8 ml und basolateral 5,5 ml gewählt; die eingesetzten Arzneistoffmengen entsprechen 1 % der klinisch eingesetzten Dosen.

Die Arbeiten beschäftigen sich vor allem mit der Anpassung simulierter intestinaler Flüssigkeiten (SIFs) an die Bedürfnisse von Caco-2-Zellen. Die Modifikation der SIFs ist nötig, um die Lebensfähigkeit der Zellen nicht zu beeinträchtigen, wie dies z.B. durch die zu hohe Osmolalität von FaSSIF passiert (Ingels et al. 2004). In diesen Versuchen stellt sich heraus, dass das Gallensalz sowohl Dissolution als auch Absorption von Substanzen steigern kann (Kataoka et al. 2003). Dieses Ergebnis wird durch andere Veröffentlichungen bestätigt (Yamashita et al. 2000). Allerdings ist der Einfluss des Cholats auf die Permeation nicht so deutlich, wie durch Steigerung der Konzentration auf der Dissolutionsseite zu erwarten wäre. Grund dafür ist, dass der Großteil des zusätzlich gelösten Arzneistoffs in die Taurocholatz-Mizellen inkorporiert wird und dadurch nicht zur Permeation zur Verfügung steht (Kataoka et al. 2006).

1.7.2.4 Das Modell von Motz et al.

Das letzte veröffentlichte Modell stellt ein auf der Dissolutionsseite offenes System dar (Abbildung 1-13; Motz et al. 2007a; Motz et al. 2007b). Der große Vorteil der Apparatur besteht in der vollständigen Automatisierung des Probenzugs und des Ersetzens des entnommenen Volumens. Dies geschieht mit Hilfe der „Sequentiellen Injektionsanalyse“ (SIA), einer Technik bei der ein computergesteuertes Mehrkanalventil mittels einer integrierten Kolbenpumpe einen Fraktionssammler beschickt. Diese Technik hat mittlerweile Eingang in ein breites Band der Analytik gefunden und wird auch bei pharmazeutischen Anwendungen standardmäßig verwendet (Assubate 2009; Vasiliki et al. 2007).

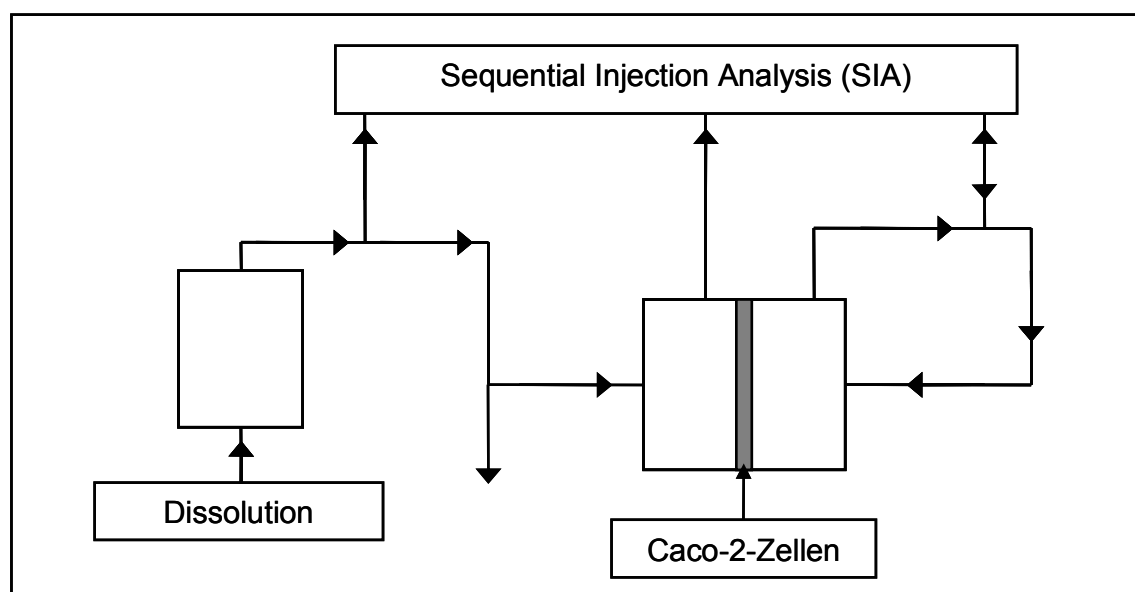


Abbildung 1-11: Das Modell von Motz et al. (2006)

Nachteil der Apparatur ist, dass nur ein Teil des Dissolutionsmediums über den Monolayer gepumpt wird und dass auf Grund der halb offenen Bauweise nur die Permeationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Freisetzungsgeschwindigkeit bestimmt werden kann. Außerdem wird durch das offene Design der Dissolutionsseite auch eventuell vorhandener modulierender Hilfsstoff aus der Formulierung gewaschen und damit aus dem System gespült, bevor er eine Wirkung entfalten und der Effekt gemessen werden kann. Auch in diesen Arbeiten werden ganze Formulierungen und deren eventuelle Effekte auf die Permeation untersucht.

1.8 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer Freisetzungsapparatur mit einem hohen Maß an Biorelevanz. Die Apparatur soll es ermöglichen, die Absorption eines BCS 2-Wirkstoffs simultan zur Freisetzung aus seinen Arzneiformen zu charakterisieren. Dies soll über die Entwicklung bzw. den Ausbau einer bereits konstruierten dynamischen Caco-2-Apparatur geschehen (Pfefferle 2006). Im ersten Teil der Arbeit soll außerdem der Einfluss von Hilfsstoffen auf die Permeation von Arzneistoffen in einem breiten Screening untersucht werden.

Die bei der Entwicklung und dem Einsatz der Apparatur auftretenden Fragestellungen sollen anhand geeigneter Modellarzneistoffe untersucht werden. Durch die Verwendung von Theophyllin soll überprüft werden, inwiefern sich die Ergebnisse, der in dieser Arbeit entwickelten Caco-2-Apparatur, mit denen einer, für eine vorangegangene Diplomarbeit konstruierten Anlage, in Einklang bringen lassen (Pfefferle 2006). Dies dient der Qualifizierung der neu entwickelten Anlage. Theophyllin unterliegt in den bisher untersuchten Konzentrationen scheinbar passiver Diffusion durch den Zellmonolayer. Durch Versuche mit höheren Theophyllin-Konzentrationen soll untersucht werden, ob der Arzneistoff auch bei diesen Bedingungen passiv transportiert wird oder ob ein bei höheren Konzentrationen sättigbarer, aktiver Transportmechanismus vorliegt. Die Vorteile von Theophyllin sind die gute analytische Zugänglichkeit und das Vorhandensein von vielen anerkannten Literaturstellen im Zusammenhang mit Caco-2-Zellen. So wird es unter anderem durch die FDA zur Qualifizierung des Caco-2-Modells vorgeschrieben (FDA 2000).

Die Versuche im Rahmen des Hilfsstoffscreenings werden mit Apafant (WEB2086) durchgeführt. Apafant ist ein bei Boehringer entdeckter PAF-Inhibitor (PAF = Plättchen Aktivierender Faktor), dessen Entwicklung in der klinischen Phase gestoppt wurde. Es dient heute weltweit als Goldstandard bei in vitro Untersuchungen zur PAF-Inhibition. Wegen seiner Affinität zum P-gp wird Apafant bei Boehringer als Modellarzneistoff zur Untersuchung der Abhängigkeit der Permeation von Stoffen vom permeability glyco-Protein verwendet (Kapitel 1.6.1). WEB2086 wird für das durchgeführte Hilfsstoffscreening eingesetzt, da der Stoff nur moderater Permeation unterliegt (Leusch et al. 2002). Dadurch können permeations-verbessernde Effekte besser abgebildet werden als z.B. bei Theophyllin, das gut permeiert und dementsprechend nur geringe Effekte zeigen kann.

Da die zur Verfügung stehende Caco-2-Fläche mit 1,13 cm² sehr klein ist und nur ein geringes Maß an Korrelation zur in vivo Situation erwarten lässt, soll versucht werden, die Zellen auf 44 cm² großen Filtern zu kultivieren. Die Caco-2-Kultur auf Filtern dieser Fläche ist bis dato nicht beschrieben. Dementsprechend werden bewachsenen Filter auf ihre Verwendbar-

keit sowohl für Standardanwendungen als auch für dynamische Applikationen untersucht. Modellarzneistoff für diese Experimente ist wieder Theophyllin.

Der für sämtliche Versuche mit ganzen Arzneiformen oder Teilen der Formulierungen verwendete Wirkstoff BIXX ist eine derzeit bei Boehringer entwickelte Substanz. Es ist eine pH-abhängig schwer-wasserlösliche schwache Base mit einem pK_a -Wert von ca. 5,9. Bei pH-Werten, die über dem pK_a -Wert liegen, zeigt es im wässrigen Milieu nur noch Löslichkeiten von ungefähr 2 $\mu\text{g/ml}$. Durch die zur Verfügung stehenden Formulierungen und den dazugehörigen in vivo Daten ist es möglich, die IVIVC zu charakterisieren und dadurch Aussagen über Biorelevanz und Korrelations-Level der entwickelten Apparaturen zu generieren. Die verwendeten Formulierungen werden später in diesem Abschnitt kurz erläutert.

Da die gewonnenen Daten aus der Caco-2-Apparatur die Grenzen des Modells aufzeigen, soll eine zweite Freisetzungsanlage entwickelt werden. Diese soll zwar keine biologische Komponente enthalten, aber dennoch BIXX aus der jeweiligen Arzneiform unter möglichst biorelevanten Bedingungen, bei gleichzeitiger Simulation der gastrointestinalen Absorption des Stoffs, freisetzen. Dazu soll der Wirkstoff mit biorelevanter Geschwindigkeit aus dem Freisetzungskompartiment entfernt werden.

Die wichtigste Anforderung an eine neu entwickelte Apparatur ist ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit. Neben dieser Anforderung wird bei der Konstruktion der beiden Apparaturen in dieser Arbeit auch Wert auf die Verwendbarkeit in der pharmazeutischen Industrie gelegt. Dementsprechend wird Augenmerk darauf gelegt, dass die Anlagen robust, das heißt möglichst wartungsfrei, laufen. Dieser Anforderung soll durch weitreichende Automation Rechnung getragen werden. Durch die Automation sollen beide Apparaturen auch möglichst anwenderfreundlich sein.

Im Rahmen der in vitro Tests mit BIXX sollen verschiedene Arzneiformen untersucht werden. Um ein möglichst breites Spektrum an Arzneiformen abzudecken, werden sowohl monolithische als auch multipartikuläre Formulierungen eingesetzt. Außerdem wird bei der Auswahl Wert darauf gelegt, dass den Prototypen unterschiedliche Freisetzungsmechanismen zugrunde liegen. Die Arzneiformen werden durch Buchstaben von einander unterschieden.

- Arzneiform E: Minitabletten, die aus vermahlenem Schmelzextrudat gepresst werden. Diese bestehen aus Wirkstoff, Weinsäure und einem Polymer, das zugesetzt wird, um die Extrusion zu erleichtern. Die Minitabletten sind mit einem retardiertem Lack befilmt, welcher zusätzlich mit einem magensaftresistenten Lack überzogen ist. Arzneiform E wird verwendet, um die zweite entwickelte Apparatur zu charakterisieren. Es werden keine in vivo Daten als Vergleich herangezogen.

- Arzneiform A: Matrixtabletten, bei denen der Wirkstoff in eine unlösliche Matrix inkorporiert wird. Die Matrix erodiert im Lauf des Versuchs und setzt den Wirkstoff so und durch Diffusion aus dem Kern frei. Zusätzlich befindet sich ein pH-abhängig lösliches Polymer als Porenbildner in der Matrix, um die Freigabe bei höheren pH-Werten zu beschleunigen. Die Matrixtablette wird in beiden entwickelten Modellen eingesetzt und untersucht.
- Arzneiform B: Pellets, bei denen der Wirkstoff auf einen Kern aus Weinsäure aufgesprüht wird. Um die Freigabe zu verzögern sind die Pellets mit einem magensaftresistenten Lack überzogen. Die Säurefreigabe wird durch ein Cellulosederivat, das auf den Kern aufgesprüht wird, mit der Wirkstofffreigabe synchronisiert. Dieser Prototyp wird ebenfalls bei beiden Modellen eingesetzt. Bei Versuchen mit der Caco-2-Apparatur wird zusätzlich zur gesamten Arzneiform, noch ein einprozentiges Aliquot der Formulierung in einem reduzierten Volumen von 9 ml untersucht.
- Arzneiform C: Pellets, die analog zu Pellets B aufgebaut sind und sich von diesen im Aufbau des Lackes unterscheiden. Unter dem magensaftresistenten Coating befindet sich eine stark retardierende Schicht aus verschiedenen Cellulosederivaten. Anhand Arzneiform C wird im zweiten, zu entwickelnden Modell die Freisetzungsmethode überprüft und verifiziert.

Die bisher gewonnenen Freisetzungsdaten der Arzneiformen zeigen große Abweichungen bezüglich ihrer IVIVC. Dies ist in den Abbildungen 1-12 bis 1-14 dargestellt. Darin ist jeweils die Freigabe der Arzneiformen in einer Standard-Paddleapparatur in zwei unterschiedlichen Medien abgebildet.

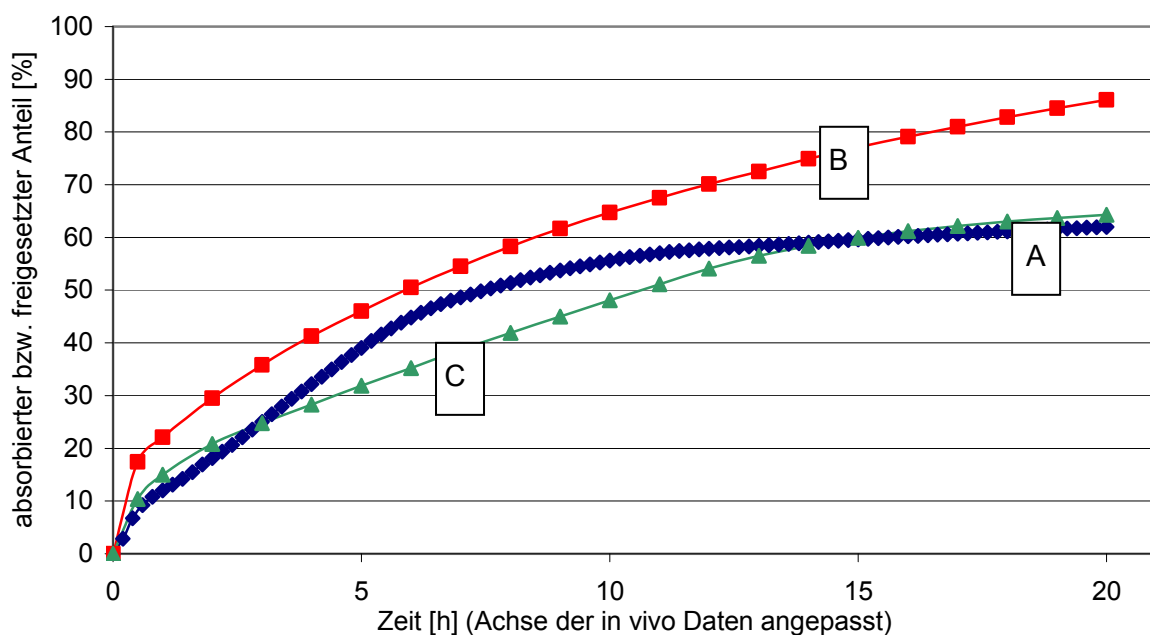


Abbildung 1-12: Bisherige Freigaben von Arzneiform A. A: in vivo Absorption; B: Freisetzung bei pH 1; C: Freisetzung bei pH 5,5 und Cremophor Zugabe [n=12]

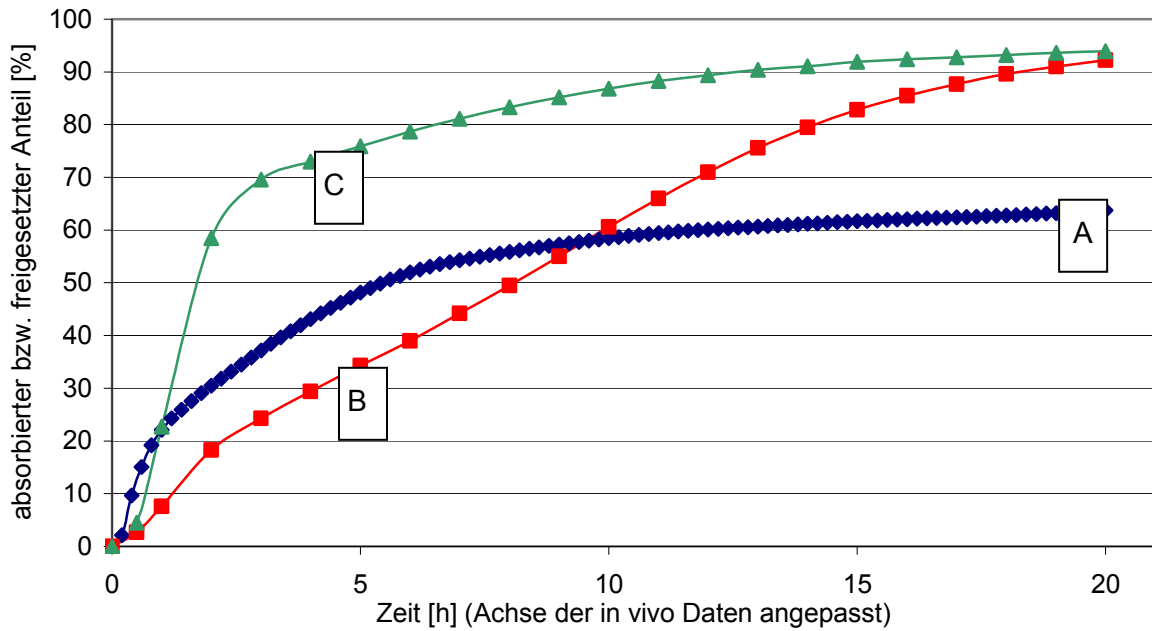


Abbildung 1-13: Bisherige Freigaben von Arzneiform B. A: in vivo Absorption; B: Freisetzung bei pH 1; C: Freisetzung bei pH 5,5 und Cremophor Zugabe [n=12]

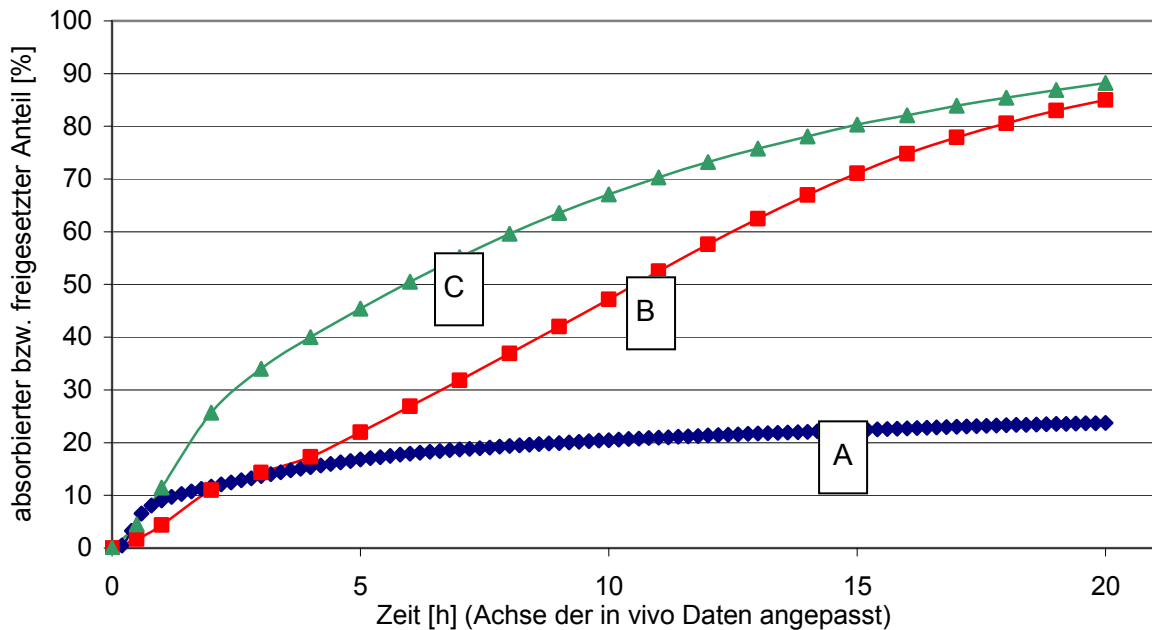


Abbildung 1-14: Bisherige Freigaben von Arzneiform C. A: in vivo Absorption; B: Freisetzung bei pH 1; C: Freisetzung bei pH 5,5 und Cremophor Zugabe [n=12]

Die gezeigten Freisetzungskurven geben die Daten der bei Boehringer für die Formulierungen entwickelten Methoden der Qualitätskontrolle wieder. Die Aussagekraft der Experimente ist für die Anwendung in der Qualitätskontrolle ausreichend, da es mit ihnen gelingt die Prototypen zu diskriminieren und zu hohen Endfreigaben zu gelangen. Es wird allerdings durch beide Freisetzungsmethoden weder der Verlauf der in vivo Absorptionskurven, noch ein qualita-

tives Ranking der Formulierungen wiedergegeben. Bei allen drei Abbildungen wurde die Zeit-Achse der klinischen Daten bereits so skaliert, wie sie später auch in den Grafiken der Versuche an der neuen Apparatur dargestellt wird. Dazu wird ein Faktor von 4,8 eingerechnet, um die Freisetzungen besser mit den Studiendaten vergleichen zu können. Dieser Faktor ergibt sich aus der Tatsache, dass die Methodenentwicklung für die in vitro Modelle darauf abzielt, den Wirkstoff schneller aus den Formulierungen freizusetzen, als es in vivo der Fall ist (Kapitel 1.4.2). Durch die forcierten Freigaben können dementsprechend 96 h in vivo Daten im gleichen Diagramm wie 20 h in vitro Daten betrachtet und mit diesen verglichen werden ($96 \text{ h}/20 \text{ h} = 4,8$). Dieser Faktor wird dementsprechend auch in dem später aufzustellenden mathematischen Vorhersagemodell für die IVIVC als time-scaling Faktor Eingang finden (Gleichung 2-4).

Neben der Entwicklung der Freisetzungsmethoden ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit, zu einem möglichst hohen Level im Rahmen der IVIVC zu gelangen (Kapitel 1.4). Dazu werden die zur Verfügung stehenden Daten einer Phase-I-Studie durch computergestütztes Modellieren mit den gewonnenen Freisetzungsdaten verglichen und der erreichte IVIVC-Level bestimmt. Durch numerische Dekonvolution werden aus Plasmaspiegelkurven, die sämtliche pharmakokinetischen Vorgänge des Wirkstoffs im Körper wieder spiegeln, Kurven generiert, welche die absorbierte Fraktion eines Stoffes über die Zeit darstellen. Durch diese kumulierte Darstellung ist es möglich, die freigesetzte Fraktion der durchgeführten in vitro Experimente direkt mit der in vivo Absorption zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 IVIVC

Die mit den entwickelten Apparaturen gewonnenen Daten sollen bezüglich ihrer Biorelevanz bzw. ihrer IVIVC mit Phase-I-Studiendaten verglichen werden.

2.1.1 UIR und Dekonvolution

Zu diesem Zweck werden in einem ersten Schritt die Plasmaspiegeldaten der BIXX-Prototypen zu in vivo Absorptionsdaten umgewandelt.

Die dazu eingesetzte Software WinNonline verwendet die Plasmakurven einer Vergleichsformulierung, hier einer i.v.-Applikation, zur Berechnung der Unit-Impuls-Response oder Gewichtsfunktion. Die i.v.-Gabe wird im hier vorliegenden Studiendesign als Infusion über 30 min verabreicht. Zur Vereinfachung des Modells wird vor dem Verarbeiten das geometrische Mittel der Plasmadaten berechnet. Dieses wird in pharmakokinetischen Modellen als Standard verwendet, da es die kleineren Werte stärker berücksichtigt und dementsprechend Ausreißer nach oben abpuffert (persönliche Kommunikation mit Christian Friedrich; Team-Member Pharmakokinetik für BIXX). Das geometrische Mittel wird nach Gleichung 2-1 berechnet.

$$\bar{X} = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n}$$

Gleichung 2-1: Geometrisches Mittel

WinNonline gibt bei der Berechnung der Gewichtsfunktion Parameter und deren Exponenten aus, die dann entsprechend Gleichung 2-2, die Impuls-Antwort der i.v.-Formulierung ergeben. Die Gewichtsfunktion entspricht der Dispositionsphase eines Wirkstoffs im Körper und beschreibt dementsprechend Verteilung und Elimination des Wirkstoffs im bzw. aus dem Körper.

$$UIR(t) = \sum_{j=1}^n A(j) \cdot e^{-\alpha(j) \cdot t}$$

Gleichung 2-2: Allgemeine Gleichung für die UIR

A Parameter

α Exponent des jeweiligen Parameters

Nachdem die Unit-Impuls-Response bestimmt ist, werden aus den Plasmaspiegelkurven, den Antwortfunktionen, durch numerische Dekonvolution die in vivo Absorptionskurven der untersuchten Formulierungen berechnet (Kapitel 1.4.4). Die erhaltenen Kurven werden als Input-Funktionen bezeichnet. Das mathematische Modellieren wird in dieser Arbeit mit Hilfe des Programms „WinNonline“ (Version 5.2 mit IVIVC-Toolkit, Pharsight), das in einer Testversion mit vollem Funktionsumfang zur Verfügung steht, durchgeführt.

Das Programm verwendet dabei eine iterative Näherung um zur Inputfunktion zu gelangen, wobei jeder Durchgang in drei Schritten abläuft.

1. Im ersten Schritt wird aus der bekannten Antwort-Funktion und der berechneten Gewichtsfunktion durch Dekonvolution eine mögliche Input-Funktion berechnet.
2. Im zweiten Schritt wird aus dieser Funktion und der Gewichtsfunktion durch Konvolution die entsprechende Antwort-Funktion modelliert.
3. Die durch den mathematischen Vorgang erhaltene Antwort-Funktion wird mit den in vivo Plasmaspiegelkurven verglichen und die Abweichungen berechnet. Diese Abweichungen dienen als Hilfe beim erneuten Durchlaufen des Prozesses.

Wenn sich die berechneten Fehler beim Durchlaufen eines Zyklus nicht mehr verändern, wird das Verfahren abgeschlossen und die erhaltenen Werte und Input-Funktionen ausgegeben (Pharsight 2007).

2.1.2 Vergleiche zwischen in vitro und in vivo Daten

Um die in vitro Performance der Prototypen mit den in vivo Daten in Bezug setzen zu können, werden unterschiedliche Parameter ermittelt. Dazu wird die maximal erreichte freigesetzte Fraktion F_d mit der absorbierten Fraktion F_a verglichen und ins Verhältnis gesetzt. Weiterhin wird die Fläche unter der Kurve (AUC) bis zum letzten gemessenen bzw. errechneten Punkt sowohl für die in vivo Daten als auch für die in vitro Daten berechnet.

$$AUC_{(0-t_n)} = \left[\frac{1}{2} (c_0 + c_1)(t_1 - t_0) \right] + \left[\frac{1}{2} (c_1 + c_2)(t_2 - t_1) \right] + \dots + \left[\frac{1}{2} (c_{n-1} + c_n)(t_n - t_{n-1}) \right]$$

Gleichung 2-3: Berechnung der AUC

Außerdem wird der f_2 -Test durchgeführt, durch den normalerweise zwei Freisetzungskurven miteinander verglichen werden. Erläutert wird der Test und die zugrunde liegende Gleichung in Abschnitt 1.4.2.

Zur Überprüfung der Deckungsgleichheit von in vitro und in vivo Kurven wird ein Graph erstellt, bei dem die absorbierte Fraktion über die freigesetzte Fraktion aufgetragen wird. Diese Art der Auftragung wird Levy-Plot genannt (Voegele 1984). Durch lineare Regression kann überprüft werden, inwiefern die Freisetzungskurve der Absorptionskurve entspricht. Je stärker Freisetzungskurve und Absorptionskurve deckungsgleich sind, desto weiter nähert sich die Steigung dieses Plottes an einen Wert von 1 an und desto höher ist der Korrelationskoeffizient.

Um eine Level A-Korrelation zu erlangen, wird die Steigung als Faktor für das mathematische Modell (Abs-Scale) eingesetzt. Als weitere Variable geht der Zeit-Faktor (Time-Scale) in das Modell mit ein. Dementsprechend hat das einfachste mathematische Modell zur Vorhersage der in vivo Absorption, die in Gleichung 2-4 dargestellt Form (Pharsight 2007).

$$F_a = (\text{Abs} - \text{Scale}) \cdot F_d(\text{Time} - \text{Scale} \cdot T_{\text{vivo}})$$

Gleichung 2-4: Gleichung des mathematischen Modells zur Level A-Korrelation

2.2 Caco-2-Zellen

2.2.1 Material

Es werden nur Chemikalien, die mindestens den Anforderungen an analytische Reinheit entsprechen, eingesetzt. Sämtliche Chemikalien werden über Merck (Merck KG, Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Fertigmedien und Lösungen werden von Invitrogen oder Seromed bezogen (Tabelle 5-2). Alle untersuchten Hilfsstoffe werden aus dem Lager von Boehringer entnommen. Diese sind entsprechend den Anforderungen der Zulassungsbehörden geprüft und für die Verwendung in Formulierungen für die Anwendung im Menschen freigegeben.

2.2.2 Zellkultur

Die bei Boehringer kultivierten Caco-2-Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) bezogen.

Die Zellen werden in einem Inkubator bei 37 °C, einer 5 %-igen CO₂ Sättigung und 95 % relativer Feuchte kultiviert (Cytoperm 2, Heraeus Christ). Um eine gleich bleibende Zellpopulation zu gewährleisten, sind bei Boehringer Zellen der Passagezahl 50 in Vials zu je $1 \cdot 10^7$ Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen werden bei Bedarf aufgetaut, abzentrifugiert, ausgezählt und zu einer Zellsuspension mit einer Konzentration von 350000 Zellen/ml verdünnt.

Da sich der Phänotyp über die Zahl der Passagen verändert (Artursson et al. 1996), werden für die vorliegende Arbeit nur die Passagen 51 - 59 für Permeationsversuche herangezogen.

Als Kulturmedium wird Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) verwendet. D-MEM enthält unter anderem 4,5 g/l Glucose und 20 mmol/l Glutamin ZUR Unterstützung der Lebensfähigkeit der Zellen. Vor der Verwendung wird es mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zum Schutz vor bakteriellem Befall versetzt.

Um die Caco-2 Zellen vor Kontamination durch z.B. Bakterien oder Pilzen zu schützen, werden alle Arbeiten aseptisch unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt (Heraeus Christ).

2.2.3 Passagieren

Die Zellen werden in Kulturflaschen mit einer Oberfläche von 75 cm² kultiviert (Cellstar, Greiner). Das Passagieren der Zellen erfolgt sowohl nach dem Auftauen als auch während der normalen Wachstumszyklen bei einer Konfluenz von max. 90 %. Diese wird in der Regel nach 5 - 7 Tagen erreicht. Ein höherer Bewachungsgrad würde zu stärkerer Adhäsion der Zellen an den Flaschenboden führen, was eine Selektion weniger adhärenter Zellen zur Folge haben könnte.

Für das Umsetzen der Zellen wird das Kulturmedium aus der Flasche entfernt und die Zellen zwei Mal mit 5 ml Dulbecco's phosphatgepufferter Kochsalzlösung (D-PBS) gespült, um das Medium vollständig von den Zellen zu waschen. Anschließend werden zu den Zellen 4 ml einer Lösung, die 0,25 % Trypsin und 0,2 % EDTA enthält, gegeben. Die Flasche wird für 5 min inkubiert, damit das Trypsin die extrazelluläre Matrix der Zellen abbauen kann und dadurch das Ablösen der Zellen vom Boden und von einander ermöglicht. Zur Inaktivierung des Trypsins und zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden werden 20 ml D-MEM zugesetzt. Die Zellen werden in diesem resuspendiert und dann quantitativ in ein Falcon-Tube (No. 227.261, Greiner) überführt.

Die Zahl der Zellen pro Milliliter Medium wird mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Es werden entweder $1 \cdot 10^6$ Zellen in eine neue Kulturflasche, in der bereits 20 ml Medium vorgelegt wurden, pipettiert (= Passagieren), oder $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/cm² auf die Filteroberfläche (siehe Abb. 2-2 und 2-3) gegeben (= Aussäen). Die Filteroberfläche wird 24 h vor der Aussaat mit einer 0,01 %-igen Collagen-Lösung imprägniert, um von Anfang an optimale Bedingungen für die Zellen zu gewährleisten (Hidalgo et al. 1989).

2.2.4 Kultivierung von Caco-2-Zellen auf Filtereinsätzen

Die Zellen werden für die Versuche in so genannten Filter-Kammer-Systemen kultiviert (Abbildung 2-1).

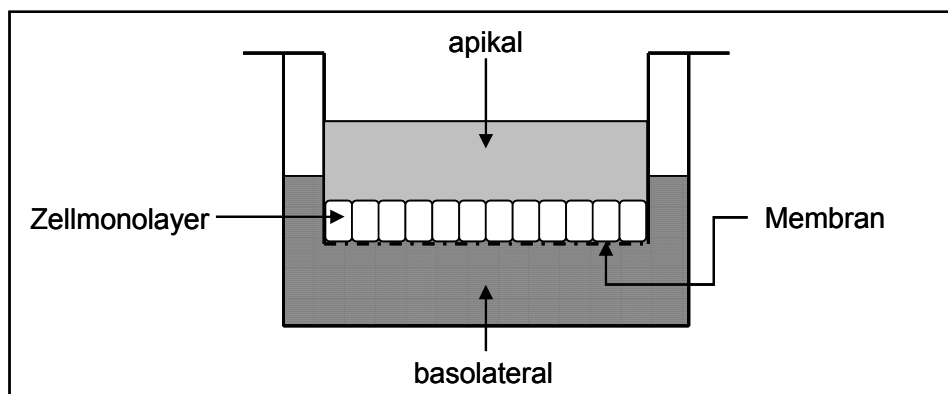


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Filter-Kammer-Systems

Beim Aussäen in Snapwell-Inserts (Abbildung 2-2), werden die Zellen entweder auf eine Polyester membran oder eine Polycarbonatmembran mit einer Fläche von 1,13 cm² und einer Porenweite von 0,4 µm aufgebracht. In den Snapwells werden die Zellen apikal (der Darminnenseite; AP) durch 0,5 ml und basolateral (der Blutseite; BL) durch 2 ml Medium versorgt.

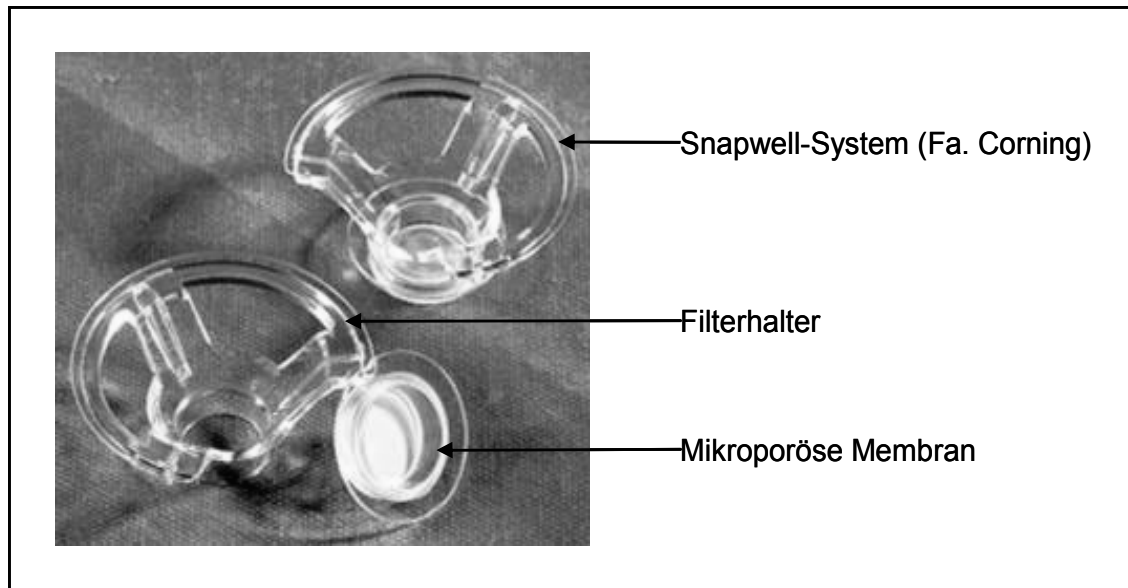


Abbildung 2-2: Snapwell-System (1,13 cm²) (Fa. Corning; Quelle: www.corning.com)

Für die Permeationsstudien mit vergrößerter Oberfläche werden Transwell-Systeme mit Polycarbonatmembran verwendet. Diese haben eine Fläche von 44 cm² und ebenfalls eine Porenweite von 0,4 µm (Abbildung 2-3). In der Kulturschale befinden sich apikal 13 ml D-MEM und basolateral 9 ml Medium, um die Zellen zu versorgen.

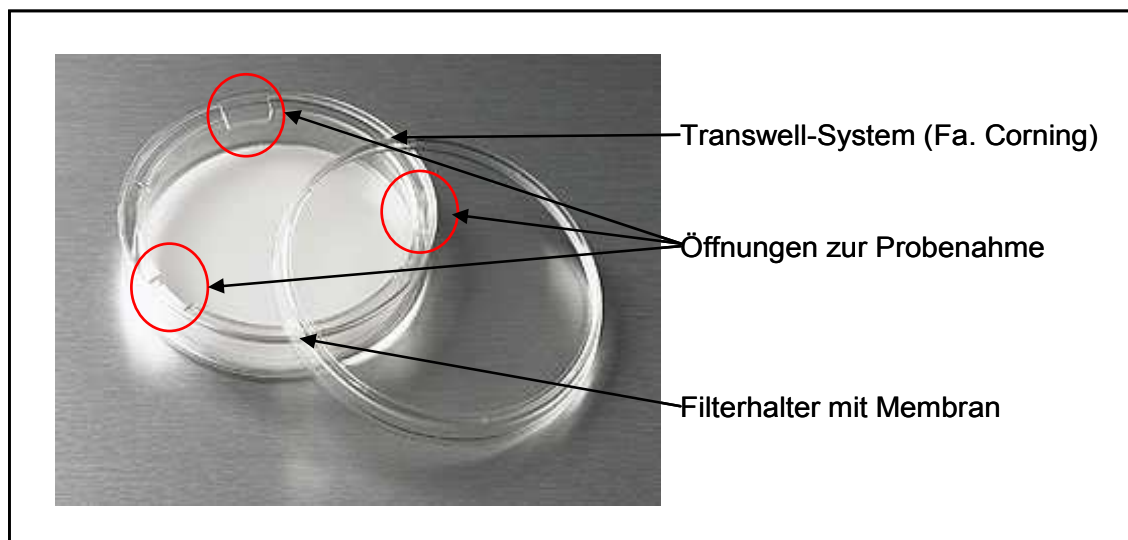


Abbildung 2-3: Transwell-System (44 cm²) (Fa. Corning; Quelle: www.corning.de)

Das Medium der Zellen wird analog zum Medium in den Kulturflaschen alle zwei Tage ausgetauscht.

2.2.5 Durchführung von Versuchen

Die Versuche werden zwischen Tag 14 und Tag 21 nach Aussaat durchgeführt. In dieser Zeit reifen die Zellen auf den Membranen zu dichten, polarisierten und ausdifferenzierten Monolayern heran. Zur Überprüfung der Eignung der kultivierten Monolayer wird der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) gemessen, um sicherzustellen, dass sich die Zellen zu einem dichten Monolayer entwickelt haben (EVOMX mit Endohm24-Elektrode, WPI). Es werden nur Zellmonolayer verwendet, die einen Widerstand über $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ aufweisen.

Alle Versuche werden je drei Mal mit drei unterschiedlichen Passagenummern durchgeführt, um interindividuelle Schwankungen innerhalb der Population zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit werden drei verschiedene Versuchstypen mit Caco-2-Zellen durchgeführt:

- Statische Versuche, um die verschiedenen Filtertypen zu testen und zu qualifizieren
- Dynamische Versuche, um das Hilfsstoffscreening durchzuführen
- Kombinierte, dynamische Versuche, um ganze Arzneiformen hinsichtlich ihrer Freisetzungs- und Permeationseigenschaften zu untersuchen.

2.2.6 Transportpuffer

Für alle Permeationsversuche wird Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) verwendet. Dieser Puffer unterstützt die Lebensfähigkeit von Caco-2-Zellen (Ginski et al. 1999a).

Die Substanzen aus Tabelle 2-1 werden in hochgereinigtem Wasser gelöst und der pH-Wert eingestellt. MES (4-Morpholino-ethan-sulfonsäure) und HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure) sind in der Zellkultur weit verbreitete Puffersubstanzen. Der MES-haltige apikale Puffer wird auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt, der HEPES-haltige basolaterale auf einen pH-Wert von 7,4. Die Einstellung der Puffer erfolgt mit 1 N NaOH.

Durch diesen pH-Gradienten wird eine bessere Korrelation zwischen in vitro Versuchen und in vivo Daten erzielt (Ingels et al. 2002). Die Osmolarität des Puffers beträgt $300 \pm 25 \text{ mosmol/kg}$.

2 Material und Methoden

Substanz	Konzentration (mmol/l)
Calciumchlorid	1,26
Kaliumchlorid	5,36
Kaliumdihydrogenphosphat	0,44
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	0,49
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,49
Natriumchlorid	136,89
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	0,34
D-Glucose	0,25
MES (pH 6,8)	0,10
HEPES (pH 7,4)	0,20

Tabelle 2-1: Zusammensetzung HBSS

2.2.7 Versuchsvorbereitung

Die benötigten Filtereinsätze werden vor Durchführung des Versuchs drei Mal mit vortemperiertem Transportpuffer gespült, um das Kulturmedium quantitativ zu entfernen. Nach Zugabe von Transportpuffer wird der Monolayer 20 min im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wird der Puffer basolateral gegen frischen ausgetauscht und apikal die entsprechende Versuchslösung vorsichtig auf den Monolayer pipettiert. Die Experimente mit großen Transwell-Filtern werden analog dazu durchgeführt, um gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen.

2.2.8 Statische Experimente

Die Versuche werden auf einem temperierten Schüttler bei einer kreisförmigen Bewegung von 100 min^{-1} durchgeführt (ST-3, Neolab). Zu bestimmten Zeiten werden Proben gezogen und in HPLC-Vials pipettiert. Die entnommenen Volumina werden direkt nach der Probenahme durch frisches, temperiertes Transportmedium ersetzt. Die HPLC-Vials werden bis zur Analyse tiefgefroren.

An Hand der per HPLC bestimmten Konzentrationen im Akzeptorkompartiment wird der Permeationskoeffizient (P_{eff}) errechnet (siehe Kapitel 2.2.9). Dieser dient als Surrogatparameter für die zu erwartende Bioverfügbarkeit des Stoffs.

Da der Caco-Monolayer auf dem Filter durch die Bewegung während des Versuchs strapaziert wird, wird im Anschluss an jeden Versuch die Integrität des Monolayers durch einen kurzen Test mit Fluorescein-Natrium überprüft.

Fluorescein-Na ist bei pH 7,4 protoniert und kann deswegen nur parazellulär, das heißt zwischen den Zellen hindurch und nicht durch die Zellen (transzellulär), ins BL-Kompartiment gelangen. Damit ist es geeignet, um die Dichtigkeit der Zellschicht zu überprüfen (Artursson et al. 1997). Dazu wird eine Lösung mit einer Konzentration von 100 µg/ml auf den Monolayer gegeben, bzw. in die Durchflusszelle injiziert. Nach 15 min wird aus dem basolateral Kompartiment eine Probe gezogen und die permeierte Menge bestimmt.

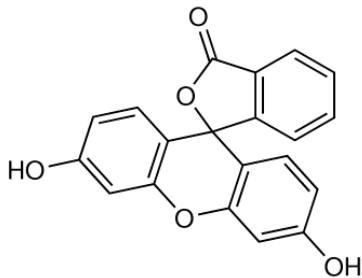


Abbildung 2-4: Fluorescein

Der Permeationskoeffizient von Fluorescein-Na darf bei diesem Nachversuch einen Wert von $1 \cdot 10^{-6}$ cm/s nicht überschreiten.

2.2.8.1 Durchführung dynamischer Versuche

Kurz vor Versuchsbeginn werden apikal die zu untersuchende Arzneistofflösung bzw. die Arzneistofflösung mit den gelösten oder suspendierten Hilfsstoffen und basolateral der Transportpuffer bis kurz vor die zweiseitige Durchflusszelle gepumpt, damit die Zellen nach dem Einsetzen des bewachsenen Filtereinsatzes schnell mit Puffer und Nährstoffen versorgt werden.

Die Filter werden nach Messung des TEER-Wertes vorsichtig von der Halterung getrennt und in die zweiseitige Durchflusszelle eingesetzt. Nach dem festen Verschrauben der Zelle wird diese möglichst gleichmäßig befüllt. Wenn beide Kompartimente der Zelle gefüllt sind, werden sowohl die Zeitnahme als auch der automatisierte Ablauf des Programms zum Probenzug gestartet.

Nach Versuchsende werden die HPLC-Vials bis zur Analyse tiefgefroren aufbewahrt.

2.2.8.2 Durchführung dynamischer, kombinierter Versuche

Die kombinierten Versuche werden analog den dynamischen Experimenten ohne Dissolution durchgeführt. Der Unterschied bei diesen Versuchen ist, dass mit dem Starten des Versuches noch die Arzneiform in das Freisetzungsgefäß, das mit 900 ml Medium gefüllt ist, gegeben wird. Die Proben werden in zwei verschiedene Racks auf den Probensammler gegeben um sicherzustellen, dass Samples aus dem apikalen Kompartiment nicht mit basolateralen Proben vertauscht werden können. Allerdings werden nur die Proben des Donorkompartiments per HPLC zu vermessen. Die resultierenden Wirkstoff-Mengen auf basolateraler Seite müssen, wegen der zu geringen Konzentrationen, in einem Labor bei Boehringer über HPLC-MS bestimmt werden. Die dazu verwendete Methode ist in dem entsprechenden Labor validiert. Auf eine ausführliche Beschreibung muss jedoch aus Vertraulichkeitsgründen verzichtet werden.

2.2.9 Ermittlung des effektiven Permeationskoeffizienten

Der effektive Permeationkoeffizient (P_{eff}) wird in Verbindung mit dynamischen Caco-2-Apparaturen häufig verwendet (Ginski et al. 1999b).

$$P_{\text{eff}} = \frac{dm}{dt} * \frac{1}{A * c}$$

Gleichung 2-5: effektiver Permeationskoeffizient

dm/dt Flux durch den Monolayer

A Fläche des Monolayers

c Konzentration im Donorkompartiment

Der Permeationskoeffizient beschreibt die Durchlässigkeit eines Zellmonolayers (Permeabilität) für eine Substanz und erlaubt so eine Einteilung der getesteten Wirkstoffe in verschiedene Klassen. Die Klassen werden bestimmten zu erwartenden Bioverfügbarkeiten zugeordnet (Yee 1997):

- $P_{\text{eff}} < 1 \cdot 10^{-6}$ cm/s (niedrige Permeation) → Bioverfügbarkeit kleiner 20 %
- $P_{\text{eff}} < 1 - 10 \cdot 10^{-6}$ cm/s (moderate Permeation) → Bioverfügbarkeit 20 – 70 %
- $P_{\text{eff}} > 10^{-6}$ cm/s (hohe Permeation) → Bioverfügbarkeit < 70 %

2.3 SPE-Apparatur

Der Name SPE-Apparatur ergibt sich aus der Funktionalität, mit dem der freigesetzte Wirkstoff aus dem Medium entfernt wird. Dies geschieht durch Festphasenextraktion bzw. - englisch - solid phase extraktion.

2.3.1 Versuchsdurchführung an der SPE-Apparatur

In der vorliegenden Arbeit werden drei unterschiedliche Versuchstypen an der SPE-Apparatur durchgeführt:

- Versuche, in denen zum Zeitpunkt $t=0$ eine bestimmte Menge Weinsäure in den Freigabepuffer gegeben wird, um zu überprüfen, wie sich Protonen im System verhalten.
- Versuche, in denen der Wirkstoff nach Freisetzung aus der Formulierung mit konstanter Pumpgeschwindigkeit aus dem Vessel entfernt wird. Durch diesen Versuchstyp werden sowohl die geeigneten weiteren Parameter wie Vesselgröße und Rührgeschwindigkeit ermittelt, als auch untersucht, ob sich durch eine Änderung der Pumpgeschwindigkeit der Verlauf der Freigabekurve und die Endfreigabe beeinflussen lässt. Damit dient dieser Versuchstyp als proof of concept.
- Freisetzungsexperimente mit verschiedenen Prototypen, um über Änderungen von Parametern wie Pumpgeschwindigkeit und pH-Verlauf ein hohes Maß an Biorelevanz zu generieren. Ziel ist es, eine möglichst gute IVIVC zu erreichen.

Zusätzlich werden, zur Darstellung der Ausgangssituation und als Vergleich zu SPE-Daten, Dissolutionsexperimente in einer Standard-Paddleapparatur durchgeführt. Dabei werden in die jeweiligen Vessel 900 ml Puffer gegeben und auf 37 °C temperiert. Zum Zeitpunkt $t=0$ werden die zu testenden Arzneiformen in das Vessel gegeben und die Freisetzung gestartet.

Sowohl SPE-Versuche als auch normale Freisetzungen werden über eine Dauer von 20 h durchgeführt. Das bedeutet, dass durch 20 h Freisetzungsexperimente 96 h Studiendaten abgebildet werden sollen. Durch diese forcierte Freisetzung wird der time-scaling Faktor bei der IVIVC auf 4,8 (vitro zu vivo) bzw. 0,2083 (vivo zu vitro) festgelegt (Kapitel 1.8).

2.3.2 Versuchsvorbereitung

Um ein Verkeimen des Säulenmaterials während längerer Stillstandsphasen zu vermeiden, wird die Säule nach den jeweiligen Versuchen mit einer Mischung aus Methanol und Wasser (9:1) gereinigt und dann, mit dieser Mischung gefüllt, bis zum nächsten Versuchstag verschlossen. Zum Entfernen des Aufbewahrungspuffers und zur Äquilibration des Gels werden mindestens 3 l des Freisetzungspuffers über die Säule gepumpt.

Um die Säule endgültig vorzubereiten, wird ungefähr 1 l temperierter Puffer direkt aus dem Freisetzungsgefäß im Kreislauf gepumpt, um das Säulenmaterial ebenfalls auf Temperatur zu bringen. Vor diesem Schritt wird das Filtermodul in den Kreislauf eingesetzt.

Für alle Freisetzungsversuche wird ein 0,05 M Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer verwendet. Dieser wird mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt. Bei Freisetzungsversuchen mit pH-Programmen wird der Puffer vor dem jeweiligen Versuch auf einen pH-Wert von 3 eingestellt.

2.3.3 Versuche mit Säure

Da Weinsäure als pH-Modifizier in den untersuchten Formulierungen verwendet wird, wird diese für die Untersuchungen zum Verhalten der Protonen in der Säule herangezogen. Die online-pH-Messung erfolgt über ein Mettler 7easy-pH-Meter und der dazugehörigen Lab-direct-Software.

Die Säure wird bei $t=0$ zu einem Volumen von 900 ml gegeben und die pH-Messung gestartet. Die Auswertung des pH-Verlaufs erfolgt graphisch direkt aus der Software des pH-Meters von Mettler.

2.3.4 Freisetzungsversuche

2.3.4.1 Freisetzungsversuche ohne pH-Modifikation

Der Puffer wird im Sotax-Bad auf 37 °C temperiert und im Kreislauf über die Säule gepumpt.

Zum Zeitpunkt $t=0$ wird die Formulierung in das Vessel gegeben und die Messung gestartet. Zur Auswertung wird die zum Zeitpunkt t im Vessel befindliche Arzneistoff-Menge berechnet und mit der bisher aus dem Freigabegefäß entfernten Menge summiert. Dadurch erhält man die Gesamtfreigabe der Arzneiform bis zum jeweiligen Zeitpunkt.

Durch die Versuchsdauer von 20 h ist sichergestellt, dass incl. Reinigung und Reäquilibration der Säule alle 24 h eine Freigabe gestartet werden kann, wodurch die Zahl der Versuche pro Woche auf ein Maximum erhöht wird.

Bei späteren Versuchen wird die Pumpgeschwindigkeit zu bestimmten Zeitpunkten manuell verändert.

2.3.4.2 Freisetzung mit pH-Modifikation

Diese Versuche werden analog zu Freisetzungen ohne pH-Modifikation durchgeführt.

Der Unterschied besteht darin, dass zeitgleich mit dem Freisetzungsversuch das Programm des Titrators gestartet wird. Dieses ist so aufgesetzt, dass es den pH-Verlauf im Vessel über die gesamten 20 h misst und den pH-Wert zu entsprechenden Zeitpunkten anhebt.

Zwischen den Versuchen sollte die pH-Sonde mindestens eine Stunde in der Aufbewahrungslösung gelagert werden, damit sich die Elektrode regenerieren kann. Nach der Regeneration wird die Sonde kalibriert und in das Freisetzungsgefäß eingesetzt.

2.3.5 Wiederfindung

Im Anschluss an die Versuche wird die Arzneiform im Vessel homogenisiert und 5 ml einer 4 N Salzsäure in das Freisetzungsgefäß gegeben. Danach wird der Inhalt des Vessels für 30 min gerührt und anschließend die Konzentration im Vessel bestimmt.

Die Summe aus Freisetzungsversuch und der gefundenen Menge in diesem Nachversuch gibt die Wiederfindung an.

2.3.6 Reinigung der Säule

Löslichkeitsversuche mit BIXX bei BI haben gezeigt, dass sich der Stoff in einer Mischung aus Methanol und Wasser im Verhältnis 9:1 relativ gut löst (persönliche Kommunikation mit Peter Sieger; Leiter der physiko-chemischen Charakterisierung bei Boehringer). Deswegen wird diese Mischung verwendet, um sowohl den Stoff von der Säule zu eluieren, als auch in Versuchspausen einen mikrobiellen Befall der Säule zu verhindern.

3 l der Mischung werden über die Säule gepumpt. Im Anschluss wird die in diesem Volumen enthaltene Wirkstoffmenge gemessen. Wenn die gefundene Menge mit der Summe aus freigesetztem und auf die Säule gebrachtem Wirkstoff übereinstimmt, wird die Reinigung als

abgeschlossen betrachtet. Bei Differenzen über 5 % werden erneut 3 l einer frischen MeOH:H₂O-Mischung zur Reinigung verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Umwandlung der Plasmakurven zu in vivo Absorptionskurven

Bei Freisetzungsversuchen wird normalerweise die freigesetzte Fraktion in Prozent über die Zeit dargestellt und betrachtet. Zur Ermittlung der Zusammenhänge zwischen in vitro Freisetzung und in vivo Konzentrationsverläufen, müssen die Plasmaspiegelkurven in eine Darstellung transformiert werden, bei der die kumuliert in den Körper aufgenommene Arzneistoffmenge über die Zeit aufgetragen werden kann. Dadurch bekommen beide Funktionen einen vergleichbaren Verlauf und die freigesetzte Fraktion F_d kann direkt mit der absorbierten Fraktion F_a verglichen werden.

3.1.1 Bestimmung der Gewichtsfunktion

Damit die Plasmakurven in Absorptionskurven umgewandelt werden können, muss zuvor aus der i.v.-Applikation des Stoffs die Gewichtsfunktion berechnet werden (siehe Abschnitt 1.4.4). Die Modellierung der Gewichtsfunktion bzw. Unit-Impuls-Response wurde mit Hilfe von WinNonline (Version 5.2) durchgeführt. In der zur Verfügung stehenden Studie wurde die BIXX als Infusion über eine Dauer von 30 min bei sieben gesunden Probanden appliziert. Je nach Komplexität der pharmakokinetischen Prozesse eines Stoffes im Körper, wird eine unterschiedlich hohe Zahl an Exponenten benötigt, um die Plasmaspiegelkurve ausreichend genau beschreiben zu können. Die Zahl der Exponenten entspricht weitgehend der Zahl der in vivo beteiligten Kompartimenten.

Für ein 3-exponentielles Modell ergeben sich beim Modellieren die folgenden Parameter:

Parameter	Wert	Standardfehler
A1	94,49	7,71
alpha1	19,63	2,11
A2	6,16	0,69
alpha2	0,89	0,22
A3	2,16	0,75
alpha3	0,11	0,04

Tabelle 3-1: Parameter des 3-exponentiellen Modells

3 Ergebnisse

Für das bi-exponentielle Modell werden durch das Programm leicht andere Parameter berechnet:

Parameter	Wert	Standardfehler
A1	81,79	6,980
alpha1	15,41	1,610
A2	6,50	0,427
alpha2	0,34	0,048

Tabelle 3-2: Parameter des 2-exponentiellen Modells

Beide Modelle führen zu ähnlich geringen Standardfehlern (Tabellen 3-1 und 3-2), was bedeutet, dass beide Modelle das Profil gleich gut beschreiben. Deswegen wird die bi-kompartimentelle und damit einfachere Beschreibung der Dispositionsphase verwendet. Durch Abbildung 3-1 wird verdeutlicht, wie gut die berechnete Gewichtsfunktion die in vivo Verhältnisse der Plasmaspiegelkurve nach Infusion des Wirkstoffs trifft.

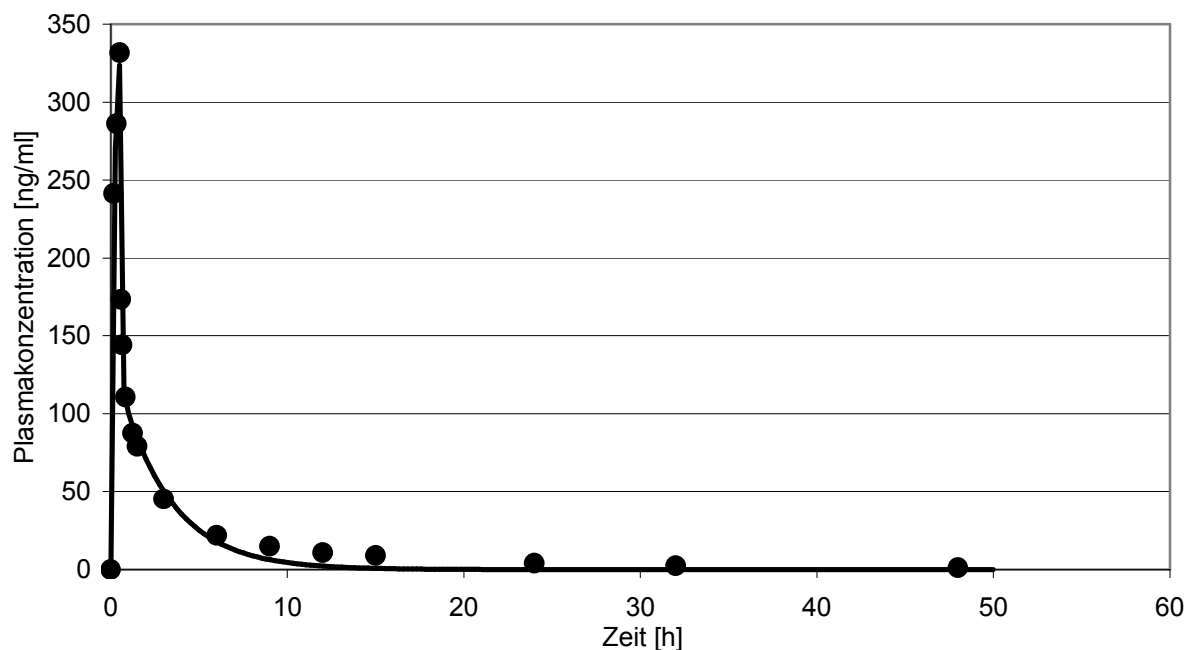


Abbildung 3-1: Graphische Darstellung des Kurvenverlaufs bei Verwendung des 2-kompartimentellen Modells. Punkte: Gemessene Plasmakonzentrationen; Linie: modellierte Gewichtsfunktion

3.1.2 Dekonvolution der Plasmaspiegelkurven

Mit Hilfe der zuvor berechneten Gewichtsfunktion kann nun die Dekonvolution der Daten durchgeführt werden. Dabei ergeben sich die in Abbildung 3-2 dargestellten Plasmaspiegelkurven für die Formulierungen A, B und C. Die Prototypen wurden von je 20 gesunden Probanden eingenommen.

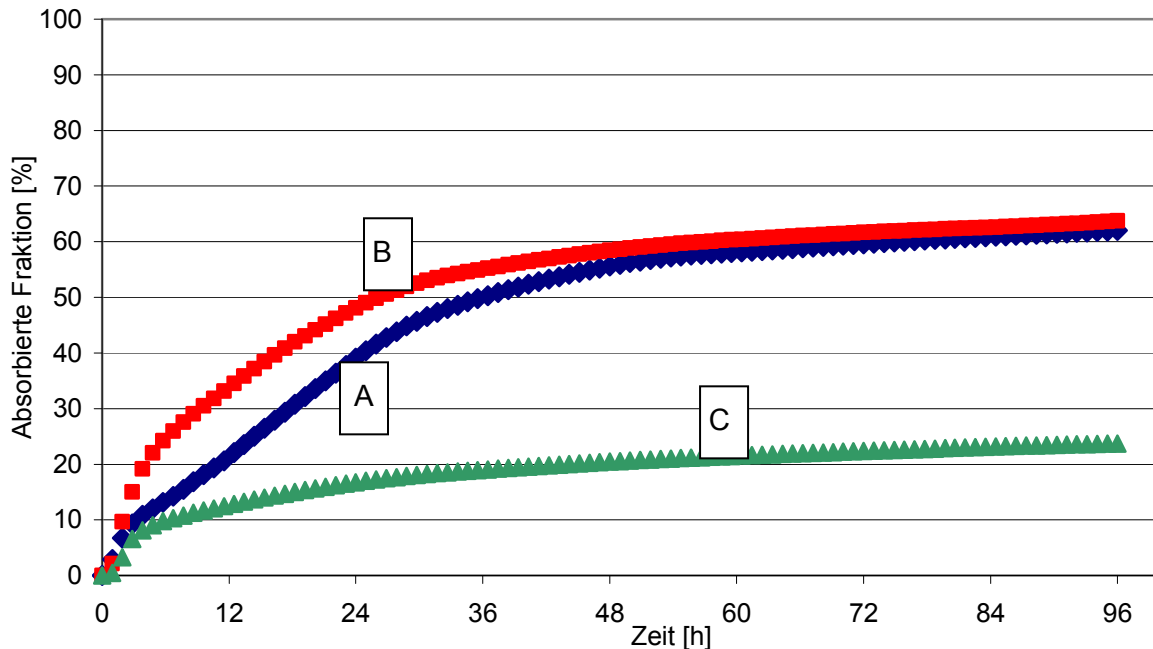


Abbildung 3-2: In vivo Absorption der untersuchten Prototypen nach Dekonvolution. A: Arzneiform A; B: Arzneiform B; C: Arzneiform C

Durch die berechneten Graphen können die Formulierungen gut miteinander verglichen werden. So unterscheiden sich die Formulierungen A und B zwar in ihrer Endfreigabe fast nicht voneinander, allerdings ist die Geschwindigkeit der Aufnahme vor allem zu Beginn deutlich unterschiedlich (Abbildung 3-2 und Tabelle 3-3). Formulierung C gibt insgesamt nur 25 % des Wirkstoffs ab, was dafür spricht, dass die Retardierung zu stark ist, um die Endfreigaben der anderen Formulierungen zu erreichen.

Formulierung	F_{abs} [%]	AUC (0-96h) [%·min]
A	62,009	59132
B	63,906	62731
C	25,276	25155

Tabelle 3-3: pharmakokinetische Parameter der drei untersuchten Formulierungen

3 Ergebnisse

Die erhaltenen Kurven und Parameter können nach dem Modellieren dazu verwendet werden, die beiden Modelle zu testen und zu bewerten (Abbildung 3-2 und Tabelle 3-3). Dazu wird wiederum die Zeit-Achse mit dem Faktor 4,8 verrechnet, um die gemeinsame Darstellung von F_a und F_d in einem Graphen zu ermöglichen.

3.2 Permeationsversuche mit Caco-2-Zellen

Wie in Kapitel 1.6 beschrieben, dienen Caco-2-Zellen mittlerweile weltweit als Modell für die Untersuchung der intestinalen Absorption von Arzneistoffen und zur Abschätzung derer Bioverfügbarkeit. Da in der vorliegenden Arbeit an verschiedenen Stellen vom Standard-Procedere abgewichen wird, werden diese Variationen vor dem Einsatz im Modell mit Daten aus der Literatur verglichen, um die Validität der erhobenen Daten zu garantieren. Ergebnisse aus einer vorangestellten Diplomarbeit bilden die Grundlage für viele Versuche dieser Arbeit (Pfefferle 2006). Diese werden zur Qualifizierung der entwickelten Caco-2-Apparatur herangezogen.

3.2.1 Aufbau und Entwicklung des Caco-2-Modells

Die in dieser Arbeit entwickelte Apparatur verwendet ebenfalls die von Motz eingeführte Sequentielle Injektionsanalytik (SIA) als Möglichkeit, Proben zu bestimmten Zeitpunkten zu ziehen und das entnommene Volumen automatisch wieder aufzufüllen (Abbildung 3-3; Motz et al. 2007a).

Allerdings wird durch den in dieser Arbeit gewählten Aufbau nicht die Konzentration des Wirkstoffs zu einem bestimmten Zeitpunkt untersucht, sondern die im jeweiligen Kompartiment kumulierte Arzneistoffmenge.

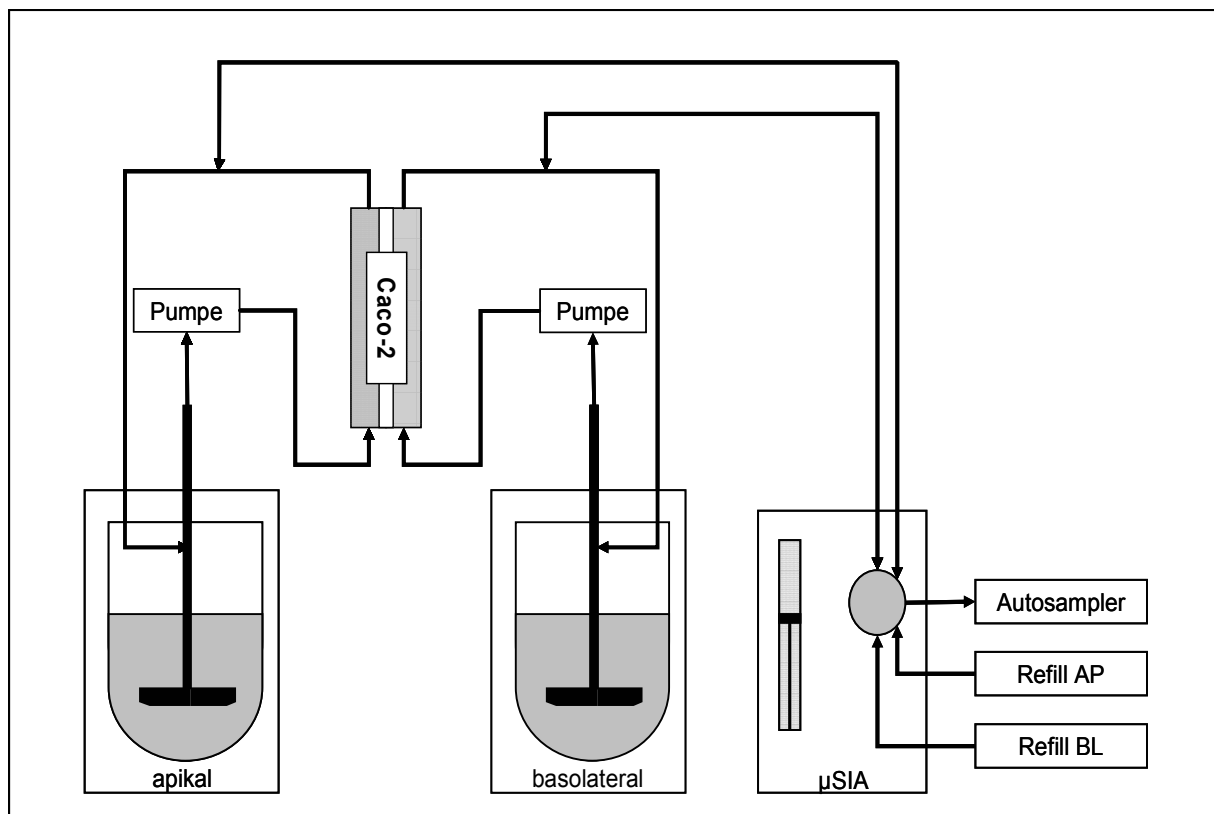


Abbildung 3-3: Schematischer Aufbau der dynamischen Caco-2-Apparatur

3 Ergebnisse

Außerdem sollen komplette Formulierungen von BIXX untersucht werden. Dieser Wirkstoff besitzt bei einem pH-Wert von 6,8 eine Dosiszahl von 200 und dementsprechend schlechte Löslichkeit. Es soll jedoch das Verhalten der Arzneiform untersucht werden und nicht nur das Löslichkeitsverhalten der Substanz in der Nähe der Sättigungslöslichkeit. Die folgende Rechen für den verwendeten Modellarzneistoff BIXX soll diese Problematik verdeutlichen. Auszugehen ist bei den Formulierungen von einer Dosis von 100 mg. Die Betrachtung wird für ein multipartikuläres Pelletsystem durchgeführt (Tabelle 3-4).

Löslichkeit (22 °C; pH 6,8)	0,002 mg/ml
$P_{\text{eff}}(\text{BIXX})$	$1,5 \cdot 10^{-4}$ cm/s
Substanzfluss (Zeit) = $P_{\text{eff}} \cdot \text{Sättigungslöslichkeit} \cdot \text{Zeit}$ [cm/s · mg/cm ³ · s]	
Substanzfluss (120 min)	0,00216 mg/1,13 cm ²
Substanzfluss (300 min)	0,0054 mg/1,13 cm ²
verglichen mit:	
Menge Wirkstoff/Pellet	ca. 0,125 mg

Tabelle 3-4: Rechenbeispiel für die zu erwartende permeierte Menge

Man sieht, dass, selbst bei Verwendung nur eines einzelnen Pellets, die durch die Zellen abtransportierte Menge nicht ausreichen würde, um die Freisetzungsrates oder die freigesetzte Fraktion merklich zu beeinflussen. Deswegen ist damit zu rechnen, dass der Einfluss des Formulierungsansatzes auf die Freisetzung nur schwer abgebildet werden kann. Würde man eine monolithische Arzneiform einsetzen, könnte man diese nur schwer teilen oder kleiner „nachbauen“, da sich dann das entscheidende Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen deutlich Richtung Oberfläche verschieben würde. Als Folge davon wäre unter anderem die initiale Freisetzung, bezogen auf die eingesetzte Menge, deutlich höher als bei Untersuchung der gesamten Arzneiform. Weiterhin wird deutlich, dass die maximal permeierende Menge direkt von der zur Verfügung stehenden Oberfläche abhängig ist. Um die Oberfläche der Monolayer zu maximieren, werden Caco-2-Zellen auf 44 cm² großen Filtern kultiviert (Kapitel 3.2.5).

3.2.1.1 Aufbau der dynamischen Caco-2-Apparatur

Der schematische Aufbau der zweiseitigen, dynamischen Caco-2-Apparatur ist in Abbildung 3-3 (Abschnitt 3.2.1) dargestellt. Die Apparatur besteht aus zwei Kompartimenten, die über den Caco-2-Monolayer, der in eine doppelseitige Diffusionszelle eingesetzt wird, verbunden sind. Beide Seiten werden durch pulsationsarme Peristaltikpumpen (MiniPuls2, Gilson) im Kreislauf gepumpt. Um das Totvolumen zu reduzieren, kommen Teflonschläuche mit einem Innendurchmesser (ID) von 0,8 mm zum Einsatz. Beide Kompartimente werden durch beheizbare Magnetrührer temperiert und gerührt (MR Hei-Tec, Heidolph). Lediglich in den Schlauchpumpen werden Tygenschläuche mit Innendurchmessern von 2,06 mm verwendet. Durch den relativ großen Innendurchmesser können die Pumpköpfe mit langsamer Geschwindigkeit betrieben werden, was die Pulsation zusätzlich reduziert. Sowohl die apikale als auch die basolaterale Seite werden mit 5 ml/min umgepumpt. In Abbildung 3-4 ist die Apparatur photographisch abgebildet. Der rechte Magnetrührer kann für Freisetzungsversuche durch ein Sotax-Freisetzungsbad (AT-7, Sotax) ausgetauscht werden.

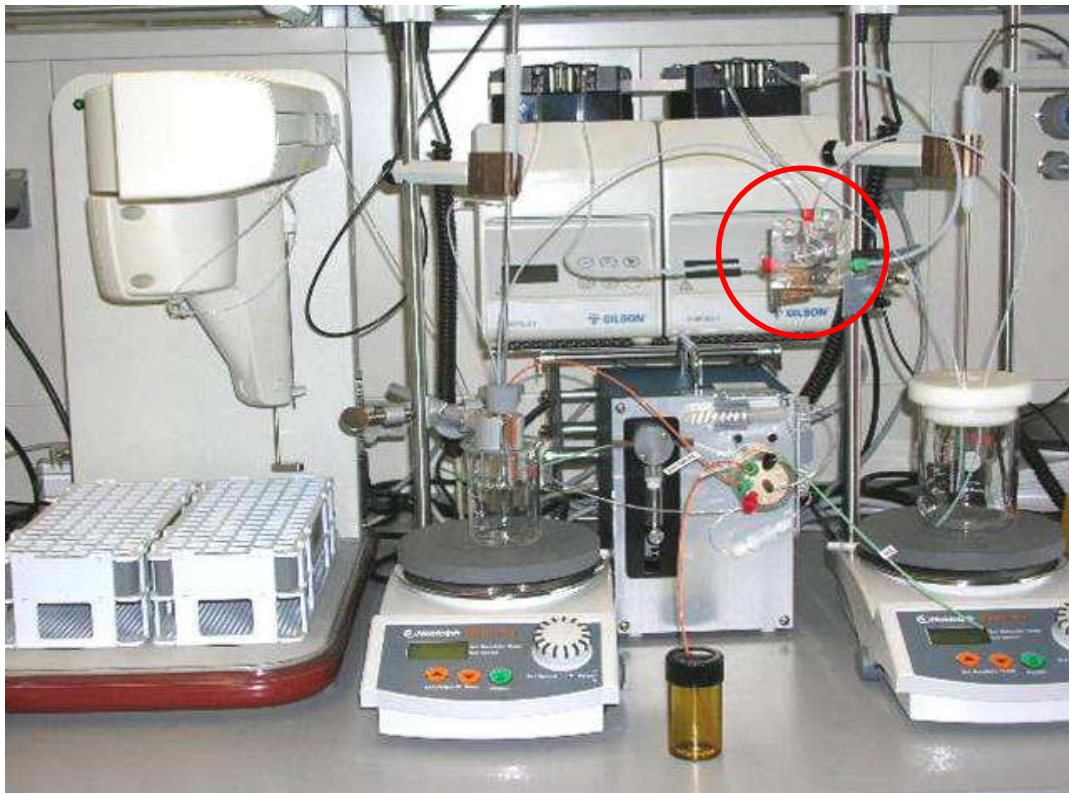


Abbildung 3-4: Dynamische Caco-2-Apparatur. Im Kreis ist der Einbauort der Diffusionszelle gekennzeichnet

Die Diffusionzelle (Kreis) besitzt beidseitig einen tangentialen Zulauf (siehe Abbildung), um eine möglichst gute Durchmischung in der Kammer zu ermöglichen (Abbildung 3-5).

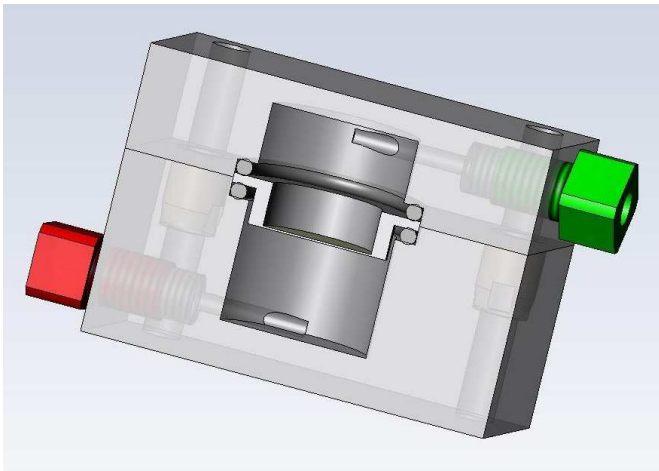


Abbildung 3-5: Schnitt durch die doppelseitige Diffusionszelle mit unten liegendem tangentialen Zulauf

Die Abläufe sind am höchsten Punkt angebracht, damit evtl. in die Kammer gelangte Luft schnell wieder aus dem System entfernt wird. Die Zelle wurde so konstruiert, dass das Volumen auf beiden Seiten des Filters gleich groß ist. Insgesamt haben beide Seiten der Apparatur ein Totvolumen von ca. 4,5 ml.

Durch die μ SIA-Anlage (Abbildung 3-6) werden die Proben vollautomatisch gezogen, an einem Autosampler (ganz links in Abbildung 3-4; AIM3200, FIA-Lab) in HPLC-Vials überführt und das entnommene Volumen ersetzt. Die μ SIA funktioniert nach dem Prinzip der sequentiellen Injektionsanalytik. Sie besteht aus einem computergesteuerten 8-Kanal-Ventil und einer Kolbenpumpe.



Abbildung 3-6: μ SIA (FIA-Lab). Rechts das steuerbare 8-Kanal-Ventil, links die Kolbenpumpe zum Ansaugen und Dosieren der jeweiligen Flüssigkeiten

Beide Kompartimente werden durch Laborrührer mit Temperierfunktionalität temperiert und gerührt. Nur bei kombinierten Versuchen mit ganzen Arzneiformen wird apikal das Sotax-Bad integriert. Die Apparatur ist so gestaltet, dass der Austausch zwischen Sotax-Bad und Laborrührer ohne weitere Umbauarbeiten durchgeführt werden kann. Dadurch ist die Anlage in ihrem Verwendungszweck äußerst flexibel gestaltet.

3.2.1.2 Probleme bei der Entwicklung der Apparatur

Alle, die Robustheit der Apparatur betreffenden Parameter, sind im Fischgrätendiagramm (Abbildung 3-7) dargestellt. Während der Entwicklung der Apparatur ergeben sich zwei kritische Parameter:

Zum einen kommt es während der ersten Versuche zur Beschädigung des Monolayers durch die Pumpen. Zu Beginn der Arbeit werden Membranpumpen (KNF-Neubert) eingesetzt, wie sie in der Arbeit von Motz beschrieben werden (Motz et al. 2007a; Motz et al. 2007b). Bei diesem Pumpentyp kommt es trotz Pulsationsdämpfern zu starker Pulsation. Durch diese Druckschläge wird die bewachsene Membran stark bewegt und die Integrität des Monolayers schnell zerstört. Durch die Verwendung peristaltischer Pumpen (Gilson Minipuls2) konnte die Pulsation auf ein für den Monolayer nicht mehr schädliches Maß reduziert werden. Dies wird durch die niedrige Permeation von Fluorescein-Na im Anschluss an die Versuche bestätigt.

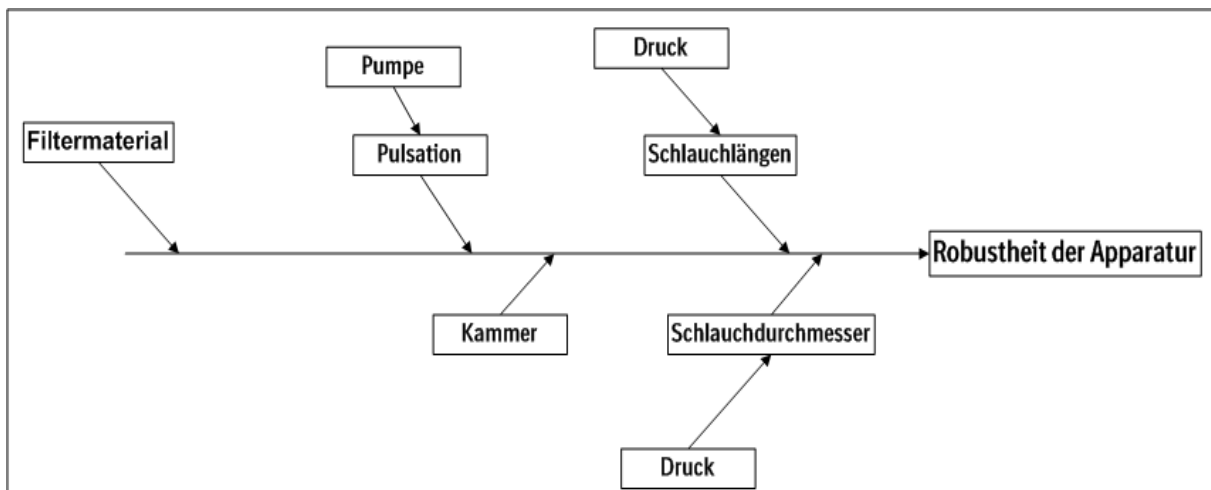


Abbildung 3-7: Fischgrätendiagramm zur Robustheit des Caco-2-Modells

Zum anderen kann das Volumen in den Kompartimenten nicht konstant gehalten werden. Das heißt es kommt je nach Set-Up zu einem Volumenstrom entweder vom apikalen in das basolaterale Kompartiment oder umgekehrt. Deswegen werden zuerst beide Seiten der Apparatur identisch gestaltet (Schlauchdurchmesser, Schlauchlängen). Nachdem diese Maßnahme das Problem nicht beheben kann, werden versuchsweise Snapwell-Einsätze aus Polyester (PE) für Vorversuche herangezogen.

3 Ergebnisse

Erst durch die Verwendung dieses Filtertyps gelingt es, die Apparatur so einzustellen, dass sie robust arbeitet. Der Unterschied zwischen den beiden Filtertypen könnte in der Hydrophilie des Polycarbonats (PC) begründet sein, welche dazu führt, dass die PC-Membran stärker quillt und damit für wässrige Systeme leichter zu überwinden ist.

Robustheit bedeutet im Zusammenhang mit der entwickelten Apparatur, dass diese im Routinebetrieb verwendet werden kann, ohne regelmäßige Änderungen an Hardware oder Programmabläufen. Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn die Anlage von verschiedenen Personen betrieben wird. Durch einen feststehenden Aufbau kann die Anlage ohne weitere Testung von jeder eingelernten Person auch nach längerem Stillstand wieder in Betrieb genommen werden.

3.2.2 Qualifizierung der Polyester-Filter

Der eingesetzte Polyester-Filter wird auch von Motz verwendet (Motz 2007). Da die Daten aus der Diplomarbeit mit dem sonst üblicherweise verwendeten Polycarbonat-Filter (PC) gewonnen wurden, werden die beiden Membranmaterialien durch Permeationsversuche miteinander verglichen. Dazu werden Versuche sowohl mit unbewachsenen als auch mit bewachsenen Membranen durchgeführt.

Stoff	Konzentration	P_{eff} (PE-Filter) [10^{-6} cm/s \pm 95 % KI]	P_{eff} (PC-Filter) [10^{-6} cm/s \pm 95 % KI]
Theophyllin	1 mg/ml	91 \pm 5,9	200 \pm 6,9
Fluorescein-Na	100 μ g/ml	57 \pm 2,6	24 \pm 3,0
Apafant	230 μ g/ml	170 \pm 12	172 \pm 18,5

Tabelle 3-5: Ergebnisse des Filter-Vergleichs ohne Zellen [n=3]

Bei Versuchen ohne Zellen ist der Permeationskoeffizient von Theophyllin bei Polyester-Membranen nur halb so hoch, wie bei Polycarbonat-Filtern. Dieses Verhältnis dreht sich für Fluorescein-Na um. Nur Apafant passiert beide Membrantypen gleich schnell (Tabelle 3-5).

Stoff	Konzentration	P_{eff} (PE-Filter) [10^{-6} cm/s \pm 95 % KI]	P_{eff} (PC-Filter) [10^{-6} cm/s \pm 95 % KI]
Theophyllin	1 mg/ml	29 \pm 3,0	44 \pm 2,1
Apafant	230 μ g/ml	21 \pm 0,3	21 \pm 0,54

Tabelle 3-6: Ergebnisse des Filter-Vergleichs mit Zellen [n=3]

Die Verhältnisse der Versuche ohne Zellen, werden durch die Versuche mit Zellen erneut abgebildet (Tabelle 3-6). Die Unterschiede in der Permeation liegen vermutlich in der Polarität bzw. Lipophilie der Stoffe und damit einhergehenden Interaktionen des jeweiligen Arzneistoffs mit dem Material der Membranen begründet.

Um die Theophyllindaten der vorliegenden Arbeit mit denen der Diplomarbeit vergleichen zu können, wird der in den Vorversuchen erhaltene Faktor 2 zukünftig bei Vergleichen von Permeationskoeffizienten, die mit unterschiedlichen Membrantypen gewonnen werden, berücksichtigt. Die Grenze für die Bestätigung dichter Monolayer durch Fluorescein-Na-Versuche wird bei dem in der Literatur genannten Wert von $1 \cdot 10^{-6}$ cm/s belassen und damit strenger gewählt als in der Literatur vorgegeben (Artursson 1991).

Die durch Kultivierung auf Polyester-Filtern erhaltenen Monolayer sind für Versuche mit der Apparatur geeignet, was durch die Messung ausreichend hoher TEER-Werte von über 200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ vor den Versuchen bestätigt wird. Alle mit einem Filtertyp erhobenen Daten können ohne Einschränkungen mit einander verglichen und in Relation gesetzt werden. Sollten Daten mit unterschiedlichen Filtermaterialien gewonnen werden, muss ein direkter Vergleich, am besten mit der gleichen Passagezahl und den gleichen Konzentrationen erfolgen. In diesen Vergleichsexperimenten berechnete Faktoren können dann auf weitere Daten angewendet werden.

3.2.3 Ergebnisse der Qualifizierung der Apparatur

Damit sichergestellt ist, dass die Ergebnisse der entwickelten Apparatur valide sind, werden Versuche mit drei Theophyllin-Konzentrationen durchgeführt und die Ergebnisse mit Literaturdaten verglichen. Für diesen Vergleich werden insbesondere die Daten der Diplomarbeit verwendet. Weiterhin wird durch diese Versuche die Fragestellung verfolgt, die am Ende der vorangestellten Diplomarbeit auftauchte. So soll während der Versuchsreihen geklärt werden, ob Theophyllin tatsächlich passiv transportiert wird, oder ob ein, erst bei höheren Konzentrationen gesättigter, aktiver Prozess bei der Absorption von Theophyllin beteiligt ist. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 3-8 dargestellt.

Aus der Gleichung zur Berechnung des Permeationskoeffizienten (Gleichung 2-5) geht hervor, dass bei ansteigender Konzentration des Wirkstoffs auch die transportierte Menge ansteigen muss, um den Permeationskoeffizienten konstant zu halten. Bei Vorliegen eines sättigbaren bzw. gesättigten, aktiven Permeationsmechanismus würde der Koeffizient dementsprechend absinken, wenn die Konzentration im Donorkompartiment erhöht wird, da die permeierte Stoffmenge nicht proportional ansteigt.

3 Ergebnisse

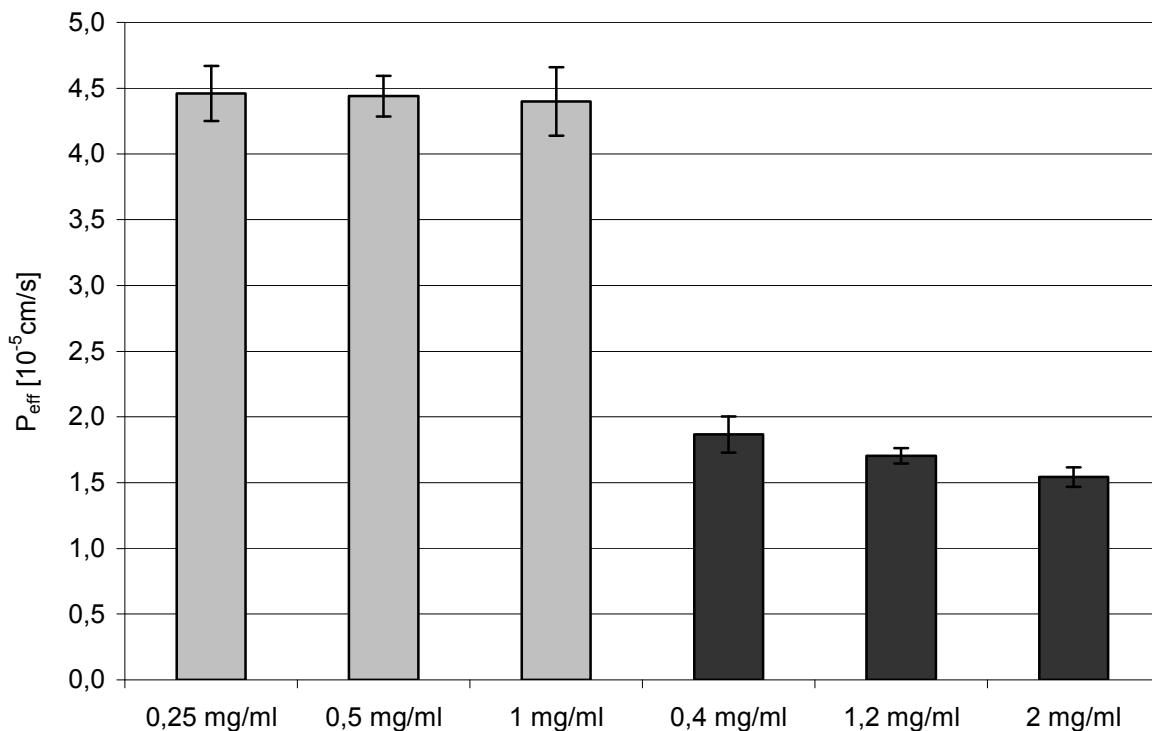


Abbildung 3-8: Permeationskoeffizienten von Theophyllin bei verschiedenen Konzentrationen. Graue Balken: Ergebnisse der Diplomarbeit an PC-Filtern; schwarze Balken: Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit PE-Filtern [$n=3 \pm 95\%$ KI]

Berücksichtigt man den, bei den Vorversuchen zur Vergleichbarkeit der Membrantypen erhaltenen Faktor von 2, ergeben sich für beide Anlagen gleiche Permeationskoeffizienten ($P_{\text{eff/Diplom}} = 44 \pm 2,1 \cdot 10^{-6}$ cm/s bzw. $P_{\text{eff/Dissertation}} = 17 \pm 0,9 \cdot 10^{-6}$ cm/s; jeweils $n=9$). Auch bei verhältnismäßig hohen Konzentrationen bleiben diese nahezu konstant.

Die in den Versuchen auftretende Tendenz zu kleineren Permeationskoeffizienten bei höheren Konzentrationen ist eher einem Flächeneffekt denn einem gesättigten, aktiven Prozess zuzuordnen. Das heißt, dass bei der relativen kleinen Fläche von $1,13 \text{ cm}^2$ eine Sättigung der Permeation alleine durch die zu geringe Zahl der Passagemöglichkeiten gegeben sein könnte. Dementsprechend ist selbst bei den eingesetzten hohen Theophyllin-Konzentrationen davon auszugehen, dass die Permeation von Theophyllin passiv und ohne sättigbare Transporter geschieht.

Die 95%-Konfidenzintervalle der Versuche mit der neu entwickelten Caco-2-Apparatur befinden sich mit Werten von maximal $0,14 \cdot 10^{-5}$ ($n=3$) auf niedrigem Niveau. Diese geringen Abweichungen vom wahren Mittelwert zeigen, dass die Ergebnisse, die mit der Apparatur erzielt werden, gut reproduzierbar sind und dass die Anforderungen an den robusten Aufbau erfüllt werden.

3.2.4 Hilfsstoffscreening mit Apafant

Nachdem viele neu entwickelte Wirkstoffe schwer-wasserlöslich sind, muss in der Formulierungsentwicklung häufig auf Hilfsstoffe zurückgegriffen werden, welche entweder die Löslichkeit des Stoffs verbessern oder dessen Permeation durch das Darmepithel und dadurch die Absorption im gastrointestinalen Trakt erleichtern.

Nachdem bisher jedoch zu vielen Hilfsstoffen keine Caco-2-Daten veröffentlicht wurden, soll in der gebauten Anlage ein breit angelegtes Screening unterschiedlicher Hilfsstoffe durchgeführt werden. Wie in Kapitel 1.6.2 beschrieben, ist es bisher äußerst aufwändig, zuverlässige Aussagen über den in vivo Einfluss von Hilfsstoffen im Intestinum zu treffen. Ein Hauptaugenmerk bei der Entwicklung des Versuchsdesigns liegt deshalb darauf, dass die Hilfsstoffkonzentrationen in einem biorelevanten Bereich liegen. Dazu wird die in den Versuchen eingesetzte Hilfsstoffmenge bezogen auf ein fiktives Tablettengewicht von 500 mg berechnet. Dementsprechend werden die Hilfsstoffe in 250 ml einer Arzneistofflösung gelöst oder, bei unlöslichen Hilfsstoffen, suspendiert. Die Konzentrationen der Hilfsstoffe im Transportpuffer berechnen sich dementsprechend nach $(500 \text{ mg} \cdot (\text{Gewichtsanteil}/100))/250 \text{ ml [mg/ml]}$.

Die Versuche werden insgesamt über eine Dauer von 90 min durchgeführt, wobei jeder Hilfsstoff drei Mal an drei unterschiedlichen Zell-Passagen auf seinen Einfluss auf die Permeation untersucht wird.

In Tabelle 3-7 sind die verwendeten Hilfsstoffe, deren Einsatzmengen und die resultierenden Konzentrationen in den Versuchen aufgelistet.

Stoff	Funktion	Gewichtsanteil		Konzentration	
		[%/500 mg]		[mg/ml]	
		min	max	min	max
Lactose Monohydrat	Füllstoff	30	80	0,6	1,6
Mikrokrist. Cellulose	Füllstoff/ Binder	5	30	0,1	0,6
Hypromellose	Binder / Matrix- bzw. Coating Polymer	1	80	0,02	1,6
Povidon	Binder / Matrixbilder	1	80	0,02	1,6
Zitronensäure	pH-Modifikator	1	20	0,02	0,4
Weinsäure	pH-Modifikator	1	20	0,02	0,4
Croscarmellose-Natrium	Sprengmittel	0,5	10	0,01	0,2

3 Ergebnisse

Crospovidone	Sprengmittel	0,5	10	0,01	0,2
Natrium Stärke Glykolat	Sprengmittel	0,5	10	0,01	0,2
Kolloidales Silikondioxid	Fließmittel	0,5	5	0,01	0,1
Magnesium Stearat	Schmiermittel	0,5	5	0,01	0,1
Cremophor	Lösungsvermittler	1	50	0,02	1
Polysorbat 80	Lösungsvermittler	1	10	0,02	0,2
PEG 400 (+ Tween 80)	Träger	10	50	0,2	1
Mittelkettige Triglyceride (+ Tween 80)	Träger	10	80	0,2	1,6
Vitamin E TPGS (+ Tween 80)	Lösungsvermittler / Permeations- verbesserer	1	5	0,02	0,1

Tabelle 3-7: Untersuchte Hilfsstoffe

In Abbildung 3-9 werden die gesamten Ergebnisse des Hilfsstoffscreenings abgebildet.

3 Ergebnisse

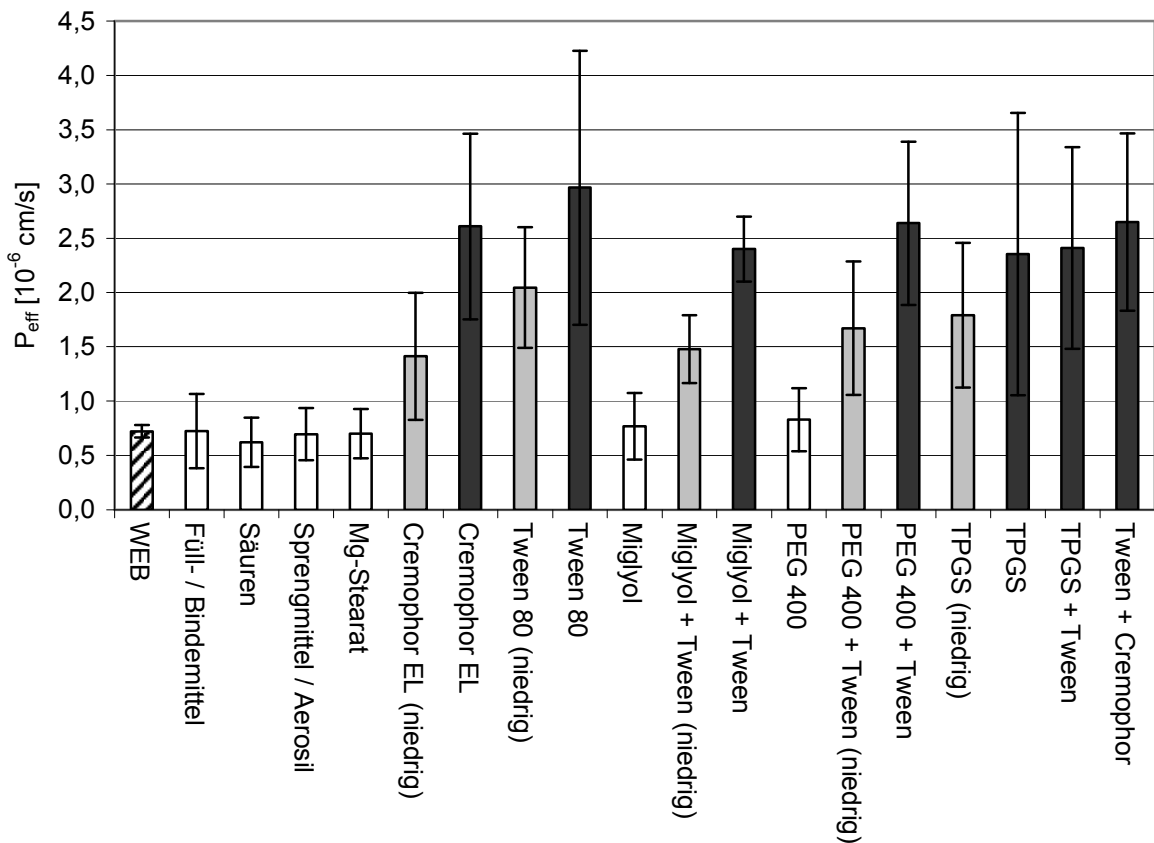


Abbildung 3-9: Zusammenfassung der Ergebnisse des Hilfsstoffscreenings: Gestreifter Balken: Permeationskoeffizient von WEB2086; weiße Balken: Kein Einfluss auf Permeation; graue Balken: moderater Einfluss auf Permeation, schwarze Balken: großer Einfluss auf Permeation [n=3-5 ± 95 % KI]

Der reine Wirkstoff diffundiert im vorliegenden Versuchsaufbau mit einem Permeationskoeffizienten von $0,72 \cdot 10^{-6}$ cm/s durch den Monolayer (gestreifter Balken). Obwohl die Permeation bei den durch weiße Balken gekennzeichneten Stoffen (bzw. -gruppen) nicht erhöht wird, steigt die Varianz der Ergebnisse deutlich an. Dies ist vermutlich auf Interaktionen zwischen den Hilfsstoffen und dem Wirkstoff zurückzuführen, die zu Schwankungen in der Permeation führen. Allerdings wird im Rahmen des Screenings auf eine genauere Untersuchung von Mechanismen verzichtet, da der Focus des neu entwickelten Apparates in der pharmazeutischen Industrie auf Automatisierung und Funktion der Apparatur liegt und nur bei unerklärlichen Phänomenen die Aufklärung des Mechanismus betrieben werden würde.

Als weiteres Ergebnis des Screenings lässt sich eine konzentrationsabhängige Permeationserhöhung durch Stoffe mit Tensidcharakter, dargestellt durch graue Balken für deren niedrige Konzentrationen und schwarze Balken für höhere Konzentrationen, erkennen (Abbildung 3-10).

3 Ergebnisse

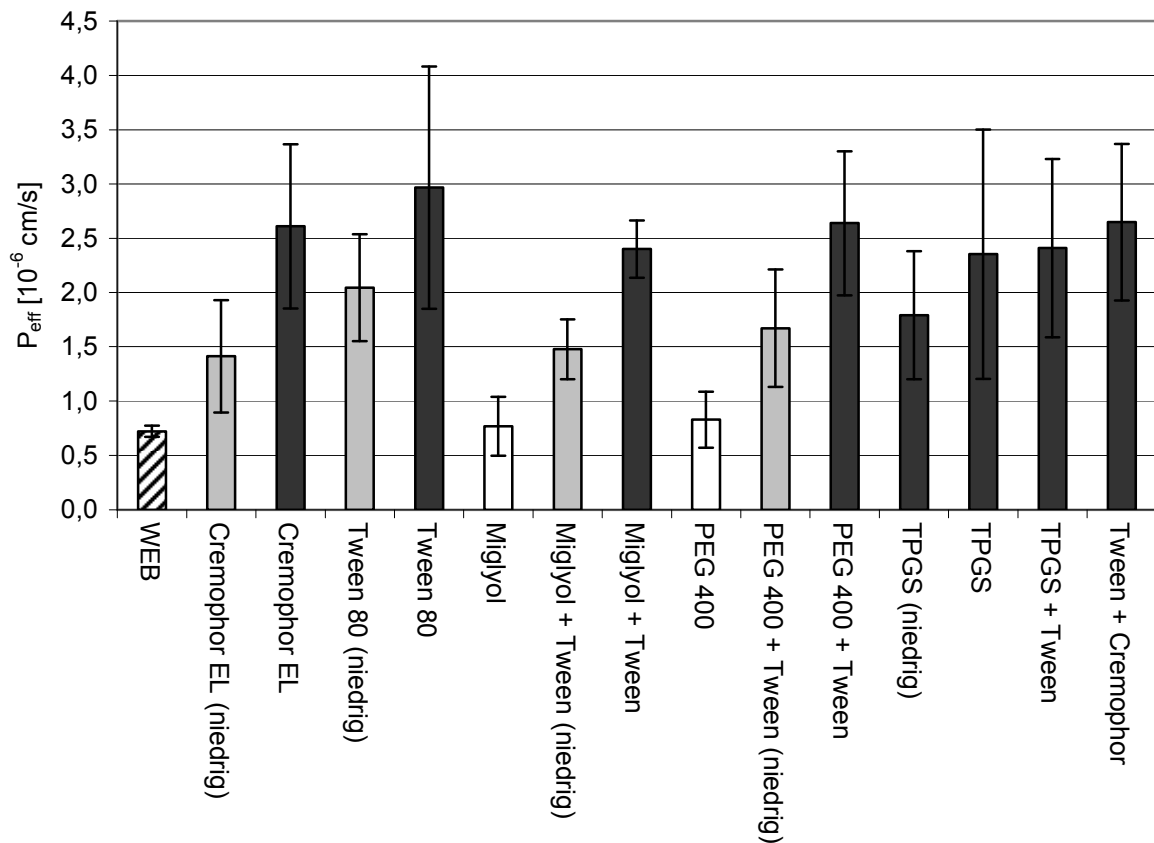


Abbildung 3-10: Konzentrationsabhängigkeit und Kombinationseffekte: Gestreifter Balken: Permeationskoeffizient von WEB2086; weiße Balken: Kein Einfluss auf Permeation; graue Balken: moderater Einfluss auf Permeation, schwarze Balken: großer Einfluss auf Permeation [n=3-5 ± 95 % KI]

Um auf statistisch signifikante Steigerung der Permeation zu testen, wird ein einseitiger ANOVA-Test mit nachfolgendem Tukey-Test durchgeführt. Alle in Abbildung 3-5 schwarz dargestellten Balken weisen bei einem Signifikanzniveau von 95 % statistisch signifikante Unterschiede bezogen auf die Permeation des reinen Stoffs auf. Es kann jedoch weder ein linearer, noch ein anders gearteter Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Konzentration der permeations-beeinflussenden Hilfsstoffe und der Erhöhung der permeierten Wirkstoff-Mengen oder der Permeationskoeffizienten gefunden werden.

Der mit einem Wert von $3,0 \cdot 10^{-6}$ cm/s höchste Permeationskoeffizient wird durch Zugabe von Tween 80 erreicht. Dieser Wert lässt sich selbst durch Kombination der hohen Einsatzkonzentration von Tween 80 und Cremophor EL nicht übertreffen. Der Permeationskoeffizient der Kombination liegt mit $2,6 \cdot 10^{-6}$ cm/s über 10 % unter dem von Tween 80, wenn dieses alleine untersucht wird.

Bei einer Charakterisierung der Obergrenze für die Permeation von Apafant lässt sich einerseits der höchste Wert der Tween 80-Lösung verwenden, andererseits kann diese auch aus den Mittelwerten der Permeationskoeffizienten sämtlicher signifikant unterschiedlicher Einzelstoffstoffe berechnet werden. Bei der zweitgenannten Methode ergibt sich eine

3 Ergebnisse

Obergrenze von $2,7 \pm 0,55 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Der Unterschied zwischen den beiden Bestimmungsarten liegt darin, dass die erste Methode den absoluten Wert des hier durchgeführten Screenings abbildet, während durch die Einbeziehung aller signifikant erhöhten Permeationskoeffizienten das statistische Mittel gebildet wird. Dadurch werden eventuelle Ausreißer nach oben abgepuffert und man erhält die scheinbare Obergrenze. Allerdings kann dann nicht mehr von einer harten Grenze gesprochen werden, sondern nur noch von einem Bereich, der durch einzelne Hilfsstoffe oder deren Kombinationen erreicht werden kann.

Insgesamt führt eine Kombination von Tween 80 mit anderen Substanzen, wie Vitamin E TPGS und Cremophor EL, Miglyol und PEG 400, zu einer Reduktion der Permeationserhöhung bezogen auf die Permeation bei Tween 80-Zugabe. Dies ist vermutlich durch die Bildung von Mischmizellen begründet, welche den Stoff inkorporieren und ihn damit nicht mehr zur Diffusion zur Verfügung stehen lassen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Caco-2-Versuchen mit FaSSIF/FeSSIF erhalten (Patel et al. 2006). Auch andere Effekte, wie z.B. Komplexierung des Wirkstoffs durch die verwendeten Hilfsstoffe sind denkbar.

In der Literatur wird die Permeabilität von Apafant durch P-gp-Inhibition nahezu verdreifacht (Leusch et al. 2002). Da in den Ergebnissen des Hilfsstoffscreenings die Permeationskoeffizienten teilweise mehr als vervierfacht werden ($F = P_{\text{eff/Hilfsstoff}}/P_{\text{eff/Apafant}}$), müssen auch bei Hilfsstoffen, welche P-gp hemmen oder inhibieren, weitere permeationsverbessernde Effekte auftreten. Graphisch wird dies in Abbildung 3-11 verdeutlicht.

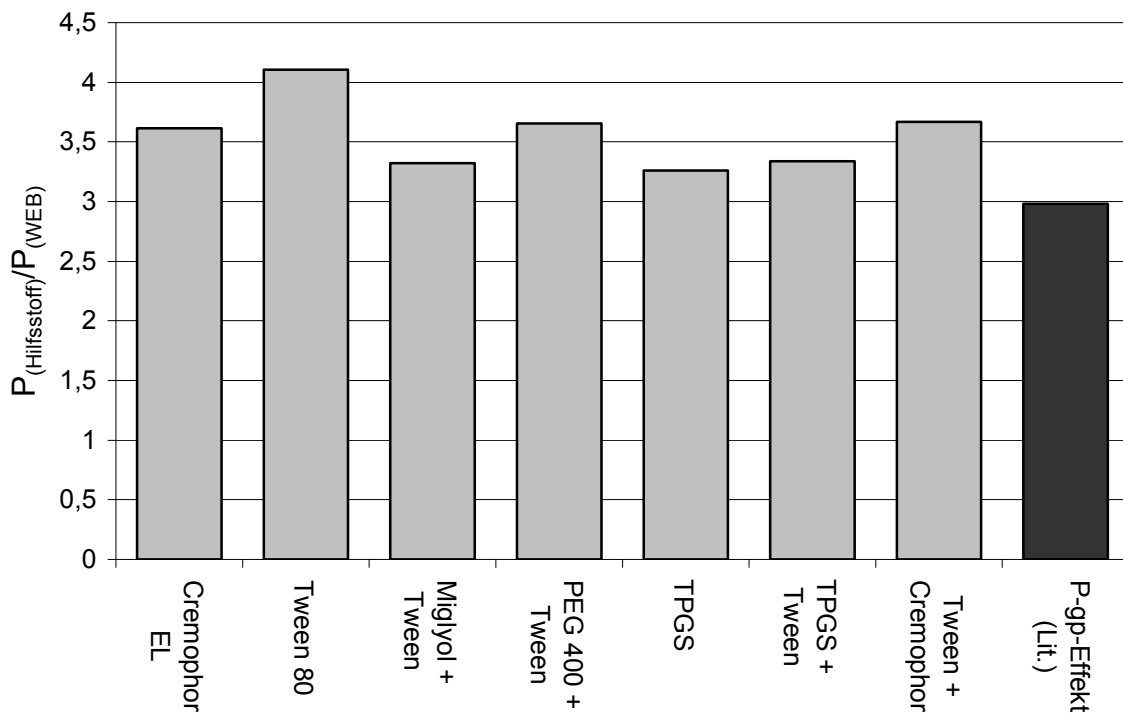


Abbildung 3-11: Quotienten $P_{\text{eff/Hilfsstoff}}/P_{\text{eff/Apafant}}$. Schwarzer Balken: P-gp-Effekt aus der Literatur; graue Balken: Effekte des durchgeführten Hilfsstoffscreenings [n=3]

3 Ergebnisse

Die Y-Achse gibt den Quotienten der Mittelwerte $P_{\text{eff/Hilfsstoff}}/P_{\text{eff/Apafant}}$ wieder. Graue Balken zeigen eine Vervielfachung des Permeationskoeffizienten um mehr als 2,9. Das bedeutet, dass die durch diese Stoffe bewirkte Permeationserhöhung nicht nur auf einer Interaktion mit dem P-gp beruhen kann, sondern eine Kombination verschiedener, der in Kapitel 1.6.2 aufgezählten, Effekte vorliegen. Die Aufklärung der Effekte könnte in weiteren Versuchen betrieben werden. So könnten z.B. Versuche in umgekehrter Permeationsrichtung durchgeführt werden (basolateral nach apikal). Auch durch den Einsatz bekannter P-gp-Inhibitoren wie Verapamil könnte der Einfluss der anderen Effekte quantifizierbar werden. Da die Aufklärung solcher Effekte jedoch nicht Ziel der Arbeiten mit dem Modell war, sei dies nur der Vollständigkeit halber und als möglicher Ausblick erwähnt.

Die Ergebnisse im Hilfsstoffscreening zeigen für einige Stoffe den erwarteten und auch in der Literatur durch statische Experimente gezeigten Effekt (Abschnitt 1.6.2). Die im Hilfsstoffscreening gewählten Parameter ermöglichen sowohl Erweiterungen um weitere Hilfsstoffe, als auch einen Switch auf andere Wirkstoffe. Das Ausmaß, der in Versuchen auftretenden und durch Hilfsstoffe verursachten Permeationserhöhung, ist für die in vivo Situation jedoch nicht bzw. nur sehr schwer zu skalieren. Dies entspricht den Aussagen aller Arbeitskreise, die den Einfluss von Hilfsstoffen an dynamischen Experimenten untersuchen.

Durch die Überlegungen, welche Parameter für dynamische Experimente verwendet werden sollten, ergeben sich allerdings automatisch biorelevantere Hilfsstoffkonzentrationen, als sie bisher bei Einsatz eines statischen Systems angewandt werden. Die erzielten Ergebnisse bestätigen den Ansatz der erhöhten Biorelevanz. Einige der in anderen Arbeiten gewonnenen Ergebnisse können widerlegt und der Widerspruch kann begründet werden.

Als Beispiel für diese Diskrepanz wird PEG 400 in der Literatur als permeationsbeeinflussender Stoff aufgeführt. Im vorliegenden Screening tritt jedoch kein Effekt durch diesen Typ des Polyethylenglykols auf. Eine Begründung ist in der niedrigeren, aber biorelevanten Konzentration des Stoffs beim hier durchgeführten Screening zu finden. Die Konzentrationen bei vergleichbaren Experimenten von bis zu 20 % (m/m) im gesamten Puffer liegen deutlich über der hier eingesetzten von 0,1 % (Hugger et al. 2002a).

Das Fazit des Hilfsstoffscreenings muss dementsprechend lauten, dass sich das Versuchdesign gut eignet, um in vitro Effekte durch dynamische Versuche abzubilden. Der Hauptgrund ist jedoch weniger im apparativen Aufbau, denn im entwickelten Versuchsdesign zu sehen. Die gewählten Konzentrationen könnten ebenfalls in statischen Experimenten eingesetzt werden. Eine Durchführung anhand von statischen Experimenten wäre deutlich schneller, da mehrere Filter parallel untersucht werden könnten. Die Durchführung des Screenings in der dynamischen Apparatur bietet sich jedoch trotzdem an, da bei einer Übertragung des Screenings auf einen neu entwickelten Arzneistoff auch die für diesen Wirkstoff entwickelten Formulierungen in dem dynamischen Modell getestet werden würden. Dadurch wäre die

Vergleichbarkeit zwischen Versuchen mit Hilfsstoffen und den kombinierten Experimenten deutlich besser. Außerdem könnten Effekte, die durch die Arzneiformen verursacht würden, durch die Untersuchung der einzelnen Hilfsstoffe schneller und leichter nachvollzogen werden.

3.2.5 Qualifizierung von 44 cm²-Membranen für Caco-2-Versuche

Bei kombinierten Versuchen werden simultan die Freisetzung des Stoffs aus seiner Arzneiform und dessen Permeation durch den Caco-2-Monolayer untersucht. Das Ziel solcher Experimente ist eine Vorhersage des Verhaltens einer Arzneiform im Körper in Bezug auf sowohl Freisetzung als auch Absorption. Da im menschlichen Körper jedoch eine Absorptions-Oberfläche im Dünndarm von 120.000 cm² zur Verfügung steht, ist eine sinnvolle Korrelation mit der bisher üblichen Filtergröße des Caco-2-Monolayers von 1,13 cm² nicht zu erwarten, da die Fläche in vivo über 100.000 mal so groß ist wie die für die in vitro Versuche zur Verfügung stehende. Um auf gleiche Verhältnisse zwischen Flüssigkeitsmengen, Arzneistoffmengen bzw. -konzentrationen und epithelialer Oberfläche zu gelangen, müssten die Versuche dementsprechend mit extrem kleinen Flüssigkeits- und Arzneistoffmengen durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz mehrerer bewachsener Filter. Die Folgen dieser Möglichkeiten wären jedoch vermutlich entweder Probleme mit der Analytik oder Handlingprobleme.

Um ein höheres Biorelevanz-Niveau bei kombinierten Versuchen zu erreichen, werden Caco-2-Zellen auf 44 cm² großen Polycarbonatfiltern kultiviert. Im ersten Schritt soll deren Eignung für Caco-2-Versuche mit Theophyllinlösungen getestet werden.

3.2.5.1 Vergleich der Permeationskoeffizienten

Die vor dem Versuch gemessenen TEER-Werte von über 200 Ω · cm² zeigen, dass die Zellen auf den 44 cm² großen Filtern zur Ausbildung intakter Monolayer fähig sind. Auch die nach dem Versuch bestimmten Permeabilitäten für Fluorescein von deutlich unter 1 · 10⁻⁶ cm/s belegen, dass die mechanische Belastung und die Bedingungen während des Versuches die Viabilität der Zellen und die Integrität des Monolayers nicht schädigen.

Es werden zwei unterschiedliche Theophyllin-Konzentrationen miteinander verglichen (Abbildung 3-12). Dabei ergeben sich für die Konzentration von 0,5 mg/ml Permeationkoeffizienten von $5,14 \pm 0,49 \cdot 10^{-5}$ cm/s für die großen Monolayer bzw. $4,44 \pm 0,15 \cdot 10^{-5}$ cm/s für den kleinen (jeweils n=3 ± 95 % KI). Bei der höheren Konzentration von 1 mg/ml werden Permeationskoeffizienten von $4,73 \pm 0,15 \cdot 10^{-5}$ cm/s am großen Filter bzw. $4,4 \pm 0,23 \cdot 10^{-5}$ cm/s am kleinen Filter bestimmt (jeweils n=3 ± 95 % KI). Nachdem sich die jeweiligen Per-

3 Ergebnisse

meationskoeffizienten der untersuchten Konzentrationen nicht unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass sich Caco-2-Zellen auch auf den verwendeten großen Filtern so kultivieren lassen, dass sie für Permeationsstudien verwendet werden können.

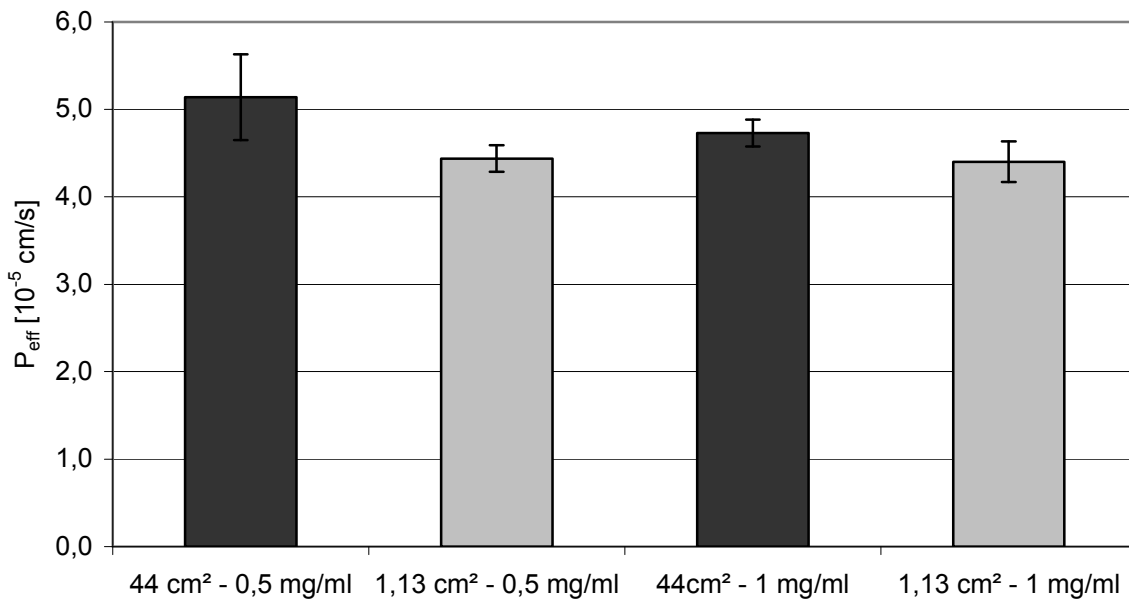


Abbildung 3-12: Vergleich zwischen 1,13 cm² großen und 44 cm² großen PC-Filtern. Schwarze Balken: Permeationskoeffizienten bei verschiedenen Theophyllin-Konzentrationen an großen Filtern; graue Balken: Permeationskoeffizienten der gleichen Konzentrationen an kleinen Filtern [n=3 ± 95 % KI]

3.2.5.2 Dynamisierung der Versuche mit 44 cm²-Membranen

Auch für diesen Membrantyp wird versucht, eine zweiseitige Durchflusszelle zu konstruieren, in die der bewachsene Filter eingesetzt werden kann (Abbildung 3-13). Allerdings tritt auch bei diesen Membranen das Problem auf, dass bei Einbau der Membranen in die Zelle und Inbetriebnahme der Pumpen, Puffer von einem Kompartiment in das andere gelangt. Dies kann auch über die Konstruktion bzw. Optimierung mehrerer Durchflusszellen hinweg nicht behoben werden. Besonderes Augenmerk bei der Konstruktion wird auf das Abdichten der Öffnungen zur Probenahme (Abbildung 2-3) gelegt. So wird versucht durch besonders weiches Dichtungsmaterial den Einsatz unterhalb der Öffnungen abzudichten. Zusätzlich wird der Rand des Einsatzes mit Vaseline als inertem und hydrophobem Dichtmittel bestrichen, um als zusätzliche Flüssigkeits-Barriere zu dienen.

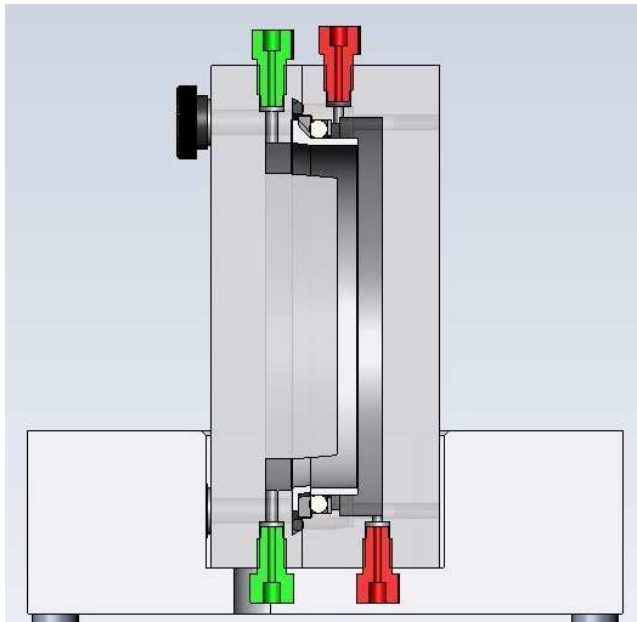


Abbildung 3-13: Schnitt durch die zweiseitige Durchflusszelle für große Membranen

Abbildung 3-13 zeigt die letzte Entwicklungsstufe, bei der der Flux zwar gering aber dennoch vorhanden ist. Versuche mit unbewachsenen Membranen zeigen, dass eine Verringerung der Flussraten zu einem minimierten Volumentransfer führt. Dies ist als deutliches Anzeichen dafür zu werten, dass die Pumpen bzw. der Druck, der durch die Pumpen aufgebaut wird, der Hauptgrund für das Phänomen sind. Allerdings scheinen, bei einem Totvolumen von je 35 ml, Flussraten von unter 3 ml/min nicht sinnvoll, da die ungerührte Wasserschicht bei den resultierenden geringen Turbulenzen in der Durchflusszelle zu groß wäre. Dadurch würde der Stofftransport behindert und die Permeationskoeffizienten würden, bedingt durch die geringen Mengen an permeiertem Arzneistoff, die wahren Verhältnisse nicht wiedergeben (Karlsson et al. 1991).

Zur Überprüfung, ob bei dieser Volumenfluktuation auch der untersuchte Arzneistoff die Zellbarriere überwindet oder ob ein reiner Verdünnungseffekt auftritt, der durch mathematische Operationen wieder ausgeglichen werden kann, werden dynamische Fluorescein-Na-Experimente durchgeführt.

Das Versuchsdesign dieser Experimente wird wie folgt gewählt:

1. Messung des TEER-Wertes zur Überprüfung der Eignung der Filter für den Versuch
2. Durchführung eines statischen Experimentes über 15 min um die Durchlässigkeit des jeweiligen Filters für Fluorescein-Na zu bestimmen
3. Vorsichtiges, dreimaliges Waschen des Filters mit frischem Transportpuffer
4. 15 min Äquilibrieren des Monolayers in frischem Transportpuffer
5. Messung des TEER-Wertes, um sicherzustellen, dass die Zellschicht noch intakt ist
6. Durchführung eines dynamischen Experimentes über 25 min

3 Ergebnisse

Während des dynamischen Experimentes wird in regelmäßigen Abständen das Volumen in beiden Kompartimenten bestimmt und dV_{a-b} als Differenz der beiden Volumina berechnet, wobei dV die Volumenänderung angibt. Die gemessenen Ergebnisse sind in Tabelle 3-8 zusammengestellt (n=3).

P_{eff} (statisch)	0,44 ± 0,06	[10 ⁻⁶ ± 95 % KI cm/s]
TEER-Änderung	keine	
Volumenänderung	1,67	[ml/25 min]
diffundierte Menge	168,27	[µg/25 min]
P_{eff} (dynamisch)	25,5 ± 1,24	[10 ⁻⁶ ± 95 % KI cm/s]
Menge Fluorescein in 1,67 ml (Ausgangskonzentration 100µg/ml)	167	[µg]

Tabelle 3-8: Ergebnisse der Funktionsprüfung für große Filter [n=3]

Nachdem die im basolateralen Kompartiment wiedergefundene Menge Fluorescein-Na derjenigen entspricht, die in dem gewanderten Volumen enthalten ist, muss davon ausgegangen werden, dass gemeinsam mit dem Transportpuffer auch Wirkstoff den Zellmonolayer passiert. Dies bedeutet, dass dynamische Versuche mit 44 cm² großen Zellmonolayern auf Grund der geschilderten Zusammenhänge nicht durchgeführt werden können.

Der Ansatz einer stark vergrößerten Oberfläche in Caco-2-Versuchen ist dementsprechend nur in statischen Versuchen erfolgreich. Wegen der Geometrie der Filtereinsätze (Abbildung 2-3) ist eine Dynamisierung nicht geglückt. Es muss angenommen werden, dass die Membranfläche zu groß ist und die Untersuchungslösung durch die zahlreichen Poren der Membran gepresst wird. Als weitere Möglichkeit könnten die Öffnungen zur Probenahme nicht ausreichend abzudichten sein. Da die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen Standard-Filtergrößen und den großen Membranen gezeigt wurde, sind jedoch Anwendungsmöglichkeiten in statischen Experimenten für BCS 2-Substanzen denkbar. Durch die große Oberfläche können analytisch sonst schlecht zugängliche Stoffe schnell und unkompliziert getestet werden, da die große permeierende Menge auch durch vergleichsweise einfache analytische Verfahren, wie UV-Messung oder HPLC, bestimmt werden kann.

3.2.6 Ergebnisse der kombinierten, dynamischen Experimente

Nachdem die Eignung der Apparatur für dynamische Experimente hinlänglich gezeigt wurde, werden die kombinierten Experimente durchgeführt, bei denen die Permeation von BIXX in Abhängigkeit von der Freisetzung aus Arzneiformen untersucht werden soll. Dabei werden zwei Formulierungen untersucht, die sich deutlich von einander unterscheiden. Dies sind zum einen die monolithische Matrixtablette A und zum anderen das multipartikuläre System der magensaftresistent überzogenen Pellets B, die in Kapseln abgefüllt sind.

Der Permeationskoeffizient von BIXX wird in dynamischen Experimenten bei einer Ausgangskonzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ bestimmt. Er erreicht dabei einen Wert von $1,55 \pm 0,13 \cdot 10^{-4} \text{ cm/s}$ ($n=3 \pm 95 \% \text{ KI}$). Damit liegt der Wert auf dem gleichen Niveau, wie der im Caco-2-Labor bei Boehringer bestimmte Permeationskoeffizient von $1,53 \pm 0,03 \cdot 10^{-4} \text{ cm/s}$ ($n=3 \pm 95 \% \text{ KI}$). Auf Grund dessen kann man davon ausgehen, dass der für die dynamische Apparatur bestimmte Wert richtig und somit für die Bewertung der Resultate aussagekräftig ist.

3.2.6.1 Freisetzung der Arzneiformen

Um alle drei Versuche miteinander vergleichen zu können, wird in Abbildung 3-14 die freigesetzte Fraktion in % aufgetragen und keine absoluten Mengen. Beide Prototypen werden in Standardvesseln in 900 ml Puffer freigesetzt. Von der multipartikulären Formulierung B wird zusätzlich 1 % der in einer Kapsel enthaltenen Pellets ausgewogen und in 9 ml freigesetzt. Dies entspricht dem Ansatz einer anderen Gruppe, die in vergleichbaren Experimenten ebenfalls sowohl Arzneistoffmenge als auch Freisetzungsvolumen auf dieses Aliquot reduzieren (Buch et al. 2009).

3 Ergebnisse

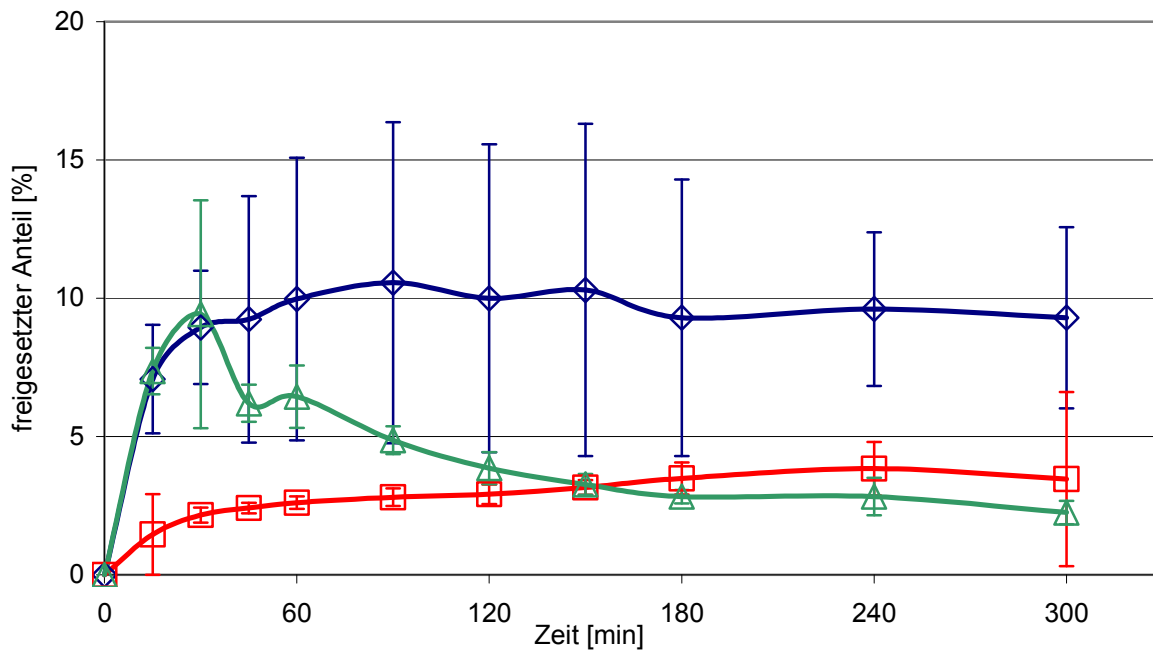


Abbildung 3-14: Freigesetzte Fraktion der verschiedenen Arzneiformen in HBSS. Karos: Matrixtablette A; Quadrate: Pellets B; Dreiecke: 1 % Pellets in 9 ml Puffer [n=3 ± 95 % KI]

Die durch offene Karos definierte Freisetzungskurve gibt den Verlauf der Freisetzung der Matrixtablette an. Die Matrix reagiert sehr stark mit dem Puffer. Sie quillt und verliert innerhalb kurzer Zeit ihre Integrität. Dementsprechend bildet die hier dargestellte Kurve eher die intrinsische Dissolution und Löslichkeit des Wirkstoffs in HBSS ab, denn die Freisetzung aus der untersuchten Formulierung. Die offensichtlich nicht reproduzierbaren Interaktionen der Hilfsstoffe der quellenden Matrixformulierung mit den noch nicht gelösten Wirkstoffpartikeln sind vermutlich der Grund für die sehr großen Fehlerbalken.

Man sieht, dass die aufgelöste Wirkstoffmenge innerhalb der ersten Stunde schnell auf ein hohes Niveau ansteigt, welches mit einer Konzentration von 17,2 µg/ml deutlich über der erwarteten Löslichkeit des Stoffs von 2 µg/ml liegt. Das erreichte Niveau wird dann über die gesamte Versuchsdauer gehalten, was auf stabile Übersättigung durch die Hilfsstoffe der Formulierung hindeutet.

Die Freigabekurve der Pelletformulierung (offene Quadrate) zeigt eher den zu erwartenden Verlauf, allerdings auf einem äußerst niedrigen Niveau. Nachdem sich der Lack im verwendeten starken Puffer sehr schnell auflöst, setzt die Freigabe sofort ein. Die zeitgleich zum Wirkstoff freigesetzte Säure wird jedoch so schnell abgepuffert, dass eine effektive pH-Beeinflussung des Freisetzungsmediums nicht stattfinden kann. Der End-pH im Freisetzungsvessel liegt trotz der relativ hohen Säuremenge bei 6,6 und damit in einem Bereich, in dem der Wirkstoff sehr schlecht löslich ist. Durch diesen Umstand ist die geringe Endfreigabe zu erklären. Die höchste Konzentration beträgt hier lediglich 7,4 µg/ml und liegt damit deut-

lich unter der bei Versuchen mit der Matrixtablette erreichten, aber deutlich über der Sättigungslöslichkeit von 2 µg/ml.

Dieselbe freigesetzte Fraktion erreicht die Arzneiform auch bei einer Reduzierung von eingesetzter Wirkstoffmenge und Freisetzungsvolumen. Diese Experimente werden mit 1 % der in einer Kapsel enthaltenen Menge in 9 ml Puffer durchgeführt (offene Dreiecke). Der Peak zu Beginn der Kurve deutet darauf hin, dass die Arzneiform bei den gewählten Bedingungen besser funktioniert als im großen Maßstab, obwohl das Verhältnis von Freisetzungsvolumen zu Wirkstoffmenge konstant bleibt. Innerhalb der ersten Stunde scheinen sowohl Übersättigungs- als auch pH-Effekte für den hohen freigesetzten Anteil verantwortlich zu sein. Allerdings ist der gemessene pH-Wert bei Versuchsende ebenfalls nur auf 6,6 reduziert. Nach 5 Stunden wird die gleiche prozentuale Freigabe erreicht, die bei Versuchen mit 100 % der Formulierung in 900 ml erzielt wird. Auch die maximal erreichte Wirkstoffkonzentration liegt mit 9,5 µg/ml auf ähnlichem Niveau, wie bei Versuchen mit der kompletten Arzneiform (7,4 µg/ml).

3.2.6.2 Permeierte Mengen

In statischen Versuchen diffundieren passiv aufgenommene Stoffe nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz (vgl. Kapitel 1.1.4). Somit hängt die aufgenommene Stoffmenge pro Zeit direkt von der zur Verfügung stehenden Arzneistoffkonzentration im Donorkompartiment ab.

Da die zur Verfügung stehende Wirkstoffmenge in dynamischen Experimenten, bedingt durch das große Volumen der Arzneistofflösung, deutlich höher ist, ergibt sich für die diffundierte Menge eine Gerade mit einer bestimmten, von der Konzentration des Stoffs auf der Donorseite abhängigen Steigung. Der Grund dafür ist die Vernachlässigbarkeit der bereits permeierten Menge im Vergleich zur Gesamtmenge an Wirkstoff, die zur Verfügung steht (Pfefferle 2006).

Die aufgenommene BIXX-Menge hängt auch bei diesen Versuchen direkt von der Konzentration des Stoffes im apikalen Kompartiment ab (Abbildung 3-15). Nach einem starken Ansteigen der Wirkstoffmenge im basolateralen Kompartiment in der ersten Stunde, wird ein Plateau bei ungefähr 5 µg erreicht, das für Arzneiform B sowohl bei Versuchen mit der ganzen Arzneiform (Rechtecke) als auch bei reduzierter Wirkstoff- und Puffermenge (Dreiecke) über die gesamte, restliche Versuchsdauer nahezu konstant bleibt. Dies könnte auf Sättigungseffekte im Inneren der Caco-2-Zellen oder sogar ein Ausfallen von BIXX in den Zellen zurückzuführen sein. Die apikal vorliegende hohe Konzentration ist bei den herrschenden pH-Verhältnissen nur durch Übersättigung erklärbar. Diese kann im Zellinnern nicht aufrechterhalten werden, da die verantwortlichen Hilfsstoffe nicht oder nicht ausreichend schnell in das Zellinnere permeieren können. Da außerdem der pH-Wert des Cytosols bei 7,4 und da-

3 Ergebnisse

mit deutlich über dem pK_a des Wirkstoffs von 5,9 liegt, scheint es ab dem Überschreiten der Sättigungskonzentration des Wirkstoffs von $2 \mu\text{g/ml}$ im Zellinnern, möglich, dass der Stoff dort präzipitiert. Durch das Ausfallen würde verhindert, dass Wirkstoff durch die basolaterale Membran der Zelle diffundiert, wodurch die Permeation quasi gestoppt wird. Die in Lösung verbleibende Wirkstoffkonzentration bzw. die Permeation des im Cytosol gelösten Stoffs wäre dann eventuell nicht mehr nachweisbar. Für einen solchen Effekt spricht, dass die permeierten Mengen nahezu identisch sind, obwohl sich die im Freigabekompartiment erreichten Konzentrationen deutlich voneinander unterscheiden.

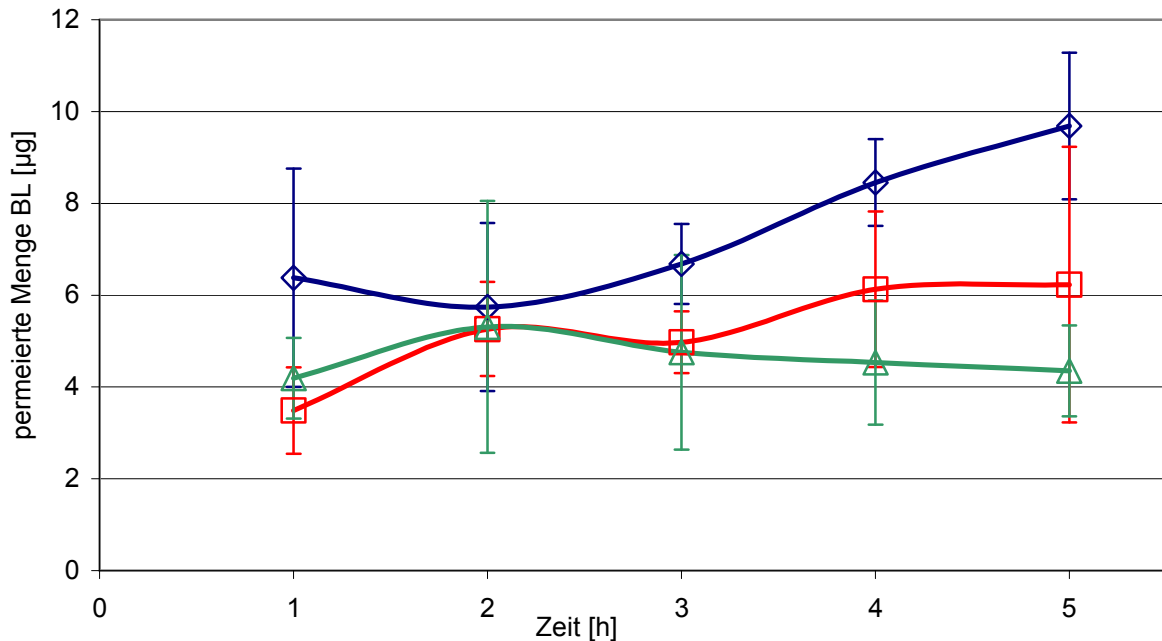


Abbildung 3-15: Permeierte Wirkstoff-Menge der dynamischen Experimente. Karos: Matrixtablette A; Quadrate: Pellets B; Dreiecke: 1 % Pellets in 9 ml Puffer [$n=3 \pm 95\% \text{ KI}$]

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung dieses Phänomens könnte eine bisher nicht entdeckte Beteiligung eines gesättigten oder blockierten aktiven Transporters sein. Dieser würde nach dem Erreichen seiner Transportkapazität bzw. der maximalen Hemmung den weiteren Transport von BIXX durch den Monolayer deutlich herabsetzen.

Eine Hemmung der Permeation durch das Erreichen der Sättigungskonzentration auf basolateraler Seite scheint ausgeschlossen. Rein rechnerisch sollten im basolateralen Volumen von 9 ml ca. $20 \mu\text{g}$ Wirkstoff löslich sein. Zieht man außerdem in Betracht, dass durch den Probenzug auch und bereits während der Versuche wieder Wirkstoff entfernt wird, könnte rein rechnerisch deutlich mehr als die hier gefundene Wirkstoffmenge durch den Monolayer permeieren.

Lediglich bei Versuchen mit der Matrixtablette (Karos) kommt es nach dem Passieren eines Plateaus nach 3 Stunden noch zu einem leichten Anstieg der Permeation von BIXX durch den Monolayer. Bei dieser Formulierung ist dementsprechend die insgesamt permeierte Menge mit 9,7 µg nach 5 h am höchsten. Eine Erklärung für diesen Unterschied zu Formulierung B könnte sein, dass die für die Übersättigung verantwortlichen Hilfsstoffe sukzessive ins Zellinnere permeieren und dort zu erneuter Übersättigung beitragen. Der (nach-)gelöste Wirkstoff würde wieder zur Permeation zur Verfügung stehen.

Weitere Aufklärung, ob eine dieser Erklärungen für den untersuchten Wirkstoff bzw. die Formulierungen Gültigkeit hat, könnte durch Uptake-Experimente geleistet werden. Durch diesen Versuchstyp kann aufgeklärt werden, wie schnell und wie viel eines Stoffes ins Zellinnere gelangt und welchem Schicksal er dort unterliegt (Takaai et al. 2010).

3.2.6.3 Permeationskoeffizienten

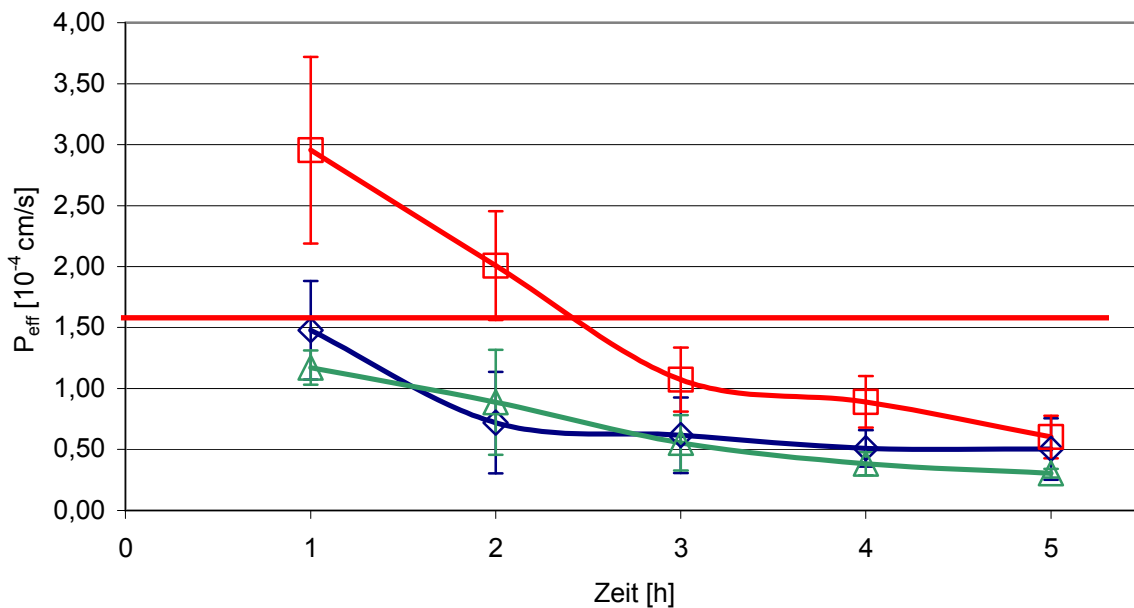


Abbildung 3-16: Permeationskoeffizienten bei kombinierten Versuchen. Karos: Matrixtablette A; Quadrate: Pellets B; Dreiecke: 1 % Pellets in 9 ml Puffer [n=3 ± 95 % KI]; Waagrechte Linie: Permeationskoeffizient von BIXX in der dynamischen Apparatur [n=3]

Die Ergebnisse der Freisetzungs- und Permeationsmessungen werden durch die Berechnung des Permeationskoeffizienten zusammengefasst.

Die aufgenommene BIXX-Menge liegt sowohl bei Versuchen mit den Pellets als auch bei Versuchen mit der Matrixtablette auf ähnlichem Niveau. Während die zur Permeation verfügbare Konzentration im Donorkompartiment bei Arzneiform B (Quadrate) jedoch im Vergleich

3 Ergebnisse

die geringste ist, wird hier der höchste Permeationskoeffizient erreicht. Dieser ist mit einem Wert von $2,95 \cdot 10^{-4}$ cm/s deutlich über jenem, der für die reine Substanz bestimmt wird ($1,55 \pm 0,13 \cdot 10^{-4}$ cm/s; $n=3 \pm 95$ % KI). Die Permeationskoeffizienten von Versuchen mit der Matrix A und reduzierter Einwaage von Pelletformulierung B liegen nach einer Stunde auf dem gleichen Niveau wie der Permeationskoeffizient des isolierten Wirkstoffs.

Die Begründung für das Absinken des Permeationskoeffizienten über den gesamten Versuchsverlauf ist in der Gleichung zur Berechnung des Permeationskoeffizienten zu finden (Gleichung 2-5). Da nach der ersten Stunde sowohl die freigesetzte, als auch die permeierte Wirkstoffmenge über die restliche Versuchsdauer nahezu konstant bleiben, sorgt alleine der Anstieg bei dt für den Abfall im Wert des Koeffizienten. Absinkende Permeationskoeffizienten könnten auch ein Anzeichen für die Beteiligung eines aktiven Transporters sein. Allerdings müsste dann, bei gleich bleibender permeierter Menge, die Konzentration des Wirkstoffes auf apikaler Seite ansteigen. Da dies nicht der Fall ist, muss davon ausgegangen werden, dass bei den hier vorliegenden Ergebnissen kein aktiver Transport beteiligt ist.

Wegen des deutlichen Unterschieds zwischen den zuvor modellierten in vivo Daten und den in diesen Experimenten gewonnenen in vitro Daten wird auf weitergehende Vergleiche entsprechend Kapitel 2.1 verzichtet. Dementsprechend muss eine der Schlussfolgerungen für dieses Modell sein, dass es zwar zuverlässig funktioniert, einer Verwendung mit gesamten Arzneiformen aber Grenzen gesetzt sind, sobald sich physiko-chemische Parameter, wie hier die Löslichkeit, im Grenzbereich bewegen und die Arzneiformen so komplex sind, dass sie stark mit den für Caco-2-Zellen nötigen Puffersystemen interagieren. Das heißt, dass je länger der Versuch dauert und je länger die Hilfsstoffe mit den Puffern und dem ungelösten Wirkstoff interagieren können, desto stärkere Effekte scheinen sie auf die Permeation des Wirkstoffes auszuüben. Die sich dadurch ergebenden Phänomene können durch den Aufbau und das Versuchsdesign allerdings nicht ausreichend genau abgebildet werden. Einer Veränderung bzw. Verbesserung dieser Situation sind jedoch enge Grenzen gesteckt. Durch die oberste Prämisse, die Integrität des Monolayers und die Viabilität der Zellen zu erhalten, können Versuche mit Variationen des Puffers oder anderer Versuchsparameter nur in einem kleinen Rahmen durchgeführt werden.

3.2.7 Bewertung der Ergebnisse der dynamischen Caco-2-Apparatur

Bei der Entwicklung der Anlage wird ein Set-Up gewählt, bei dem die gesamte freigesetzte Wirkstoffmenge und nicht nur die Permeation des Arzneistoffes, in Abhängigkeit von der Freisetzungsgeschwindigkeit, betrachtet wird. Diese Entscheidung wird getroffen, um freisetzungsbedingte, höhere Konzentrationen von sowohl Wirkstoff als auch der untersuchten bzw. in der Formulierung enthaltenen Hilfsstoffe zu ermöglichen. Dieser Aufbau ermöglicht eine Art worst case-Szenario für die Caco-2-Zellen, durch das untersucht werden kann, ob die experimentelle Situation Einfluss auf die Permeation hat. Dieses Szenario besteht in der Möglichkeit, dass es durch die lange Versuchsdauer und die möglichen großen Wirk- oder Hilfsstoffmengen zu Toxizitätseffekten kommt, durch welche die Lebensfähigkeit der Zellen oder die Integrität des Monolayers abnehmen. Erkennbar wären solche Effekte durch einen plötzlichen raschen Anstieg des untersuchten Stoffes im basolateralen Kompartiment oder hohe Fluorescein-Na-Permeation. Da die Eignung der Apparatur jedoch durch die geringen Schwankungen innerhalb der Wiederholungsexperimente bewiesen wurde, kann es als ausgeschlossen betrachtet werden, dass ein plötzlicher, überproportionaler Anstieg der permeierten Menge auf Artefakten durch apparative Parameter beruht. Durch den modularen Aufbau bietet die Apparatur die Möglichkeit zum schnellen und sicheren Umbau auf apikaler Seite. Dieser kann von Sotax-Apparatur zu Laborrührer durchgeführt werden, wobei keine weiteren apparativen Anpassungen nötig sind, um das System mit dem jeweils anderen Gerät zu betreiben.

Allerdings zeigen die Ergebnisse der kombinierten, dynamischen Versuche, dass die Notwendigkeit zur Verwendung von sehr sensiblen und hochauflösenden Analytikmethoden, wie Massenspektrometrie oder Kapillarelektrophorese, gegeben ist. Stoffe, welche nur in geringen Mengen in das basolaterale Kompartiment permeieren, können nur durch solche Verfahren quantifiziert werden. Da viele neu entwickelte Wirkstoffe sehr schlecht wasserlöslich sind, könnten die genannten Analytikmethoden oder der Einsatz radioaktiver Wirkstoffe zukünftig immer häufiger nötig werden. Eine Möglichkeit zur Umgehung dieser Problematik wurde in dieser Arbeit bereits aufgezeigt. Durch den Einsatz der 44 cm² großen Filter könnten, zumindest in statischen Experimenten, solche schwer-wasserlöslichen Stoffe auch durch „normale“ HPLC-Anlagen oder UV-metrisch quantifiziert werden, da die permeierten Mengen wegen des großen Filters deutlich größer sind, als bei Verwendung der 1,13 cm² Standardfilter.

Ein Manko der Apparatur ist die aufwändige Methode beim Probenzug. Das Programm der sequentiellen Injektionsanalyse-Anlage (SIA) ist relativ komplex, wodurch nur ungefähr alle fünf Minuten Proben gezogen werden können. Als Folge davon können die Konzentrationsverläufe, besonders zu Beginn der Versuche, nur begrenzt aufgelöst dargestellt werden. Allerdings wird durch das Programm auch sichergestellt, dass alle Leitungen vor dem Ansaugen eines neuen Mediums, das immer auch einhergeht mit einer anderen Konzentration

on des untersuchten Stoffs, gespült werden. Dadurch ist eine Verschleppung von Wirkstoff vom apikalen Teil der Apparatur in den basolateralen nahezu ausgeschlossen. Dies ist vor allem bei den extrem niedrigen Konzentrationen im Akzeptorkompartiment bei BCS 2-Substanzen wichtig. Das genaue Programm der SIA-Anlage ist im Anhang (Abschnitt 5.2) aufgeführt.

Die Anforderungen an die entwickelte Apparatur für den Einsatz in der pharmazeutischen Industrie werden erfüllt. Durch das hohe Maß an Automation ist die Bedienbarkeit bzw. das Erlernen des Umgangs mit der Apparatur durch weitere Anwender schnell und leicht möglich. Ein weiterer Vorteil der Automation ist, dass die Vorbereitung des nächsten Versuchs nahezu vollständig parallel zur Durchführung des momentan durchgeführten ablaufen kann. Auf diese Art können pro Tag bis zu vier Versuche im Rahmen eines Hilfsstoffscreenings durchgeführt werden. Voraussetzung ist allerdings, dass stets kultivierte Caco-2-Monlayer zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund ist eine Zusammenarbeit mit einem spezialisierten Caco-2-Labor von Vorteil.

Die in den kombinierten, dynamischen Versuchen erzielten Ergebnisse zeigen leider auch, dass nicht alle Wirkstoffe bzw. nicht alle Formulierungen geeignet sind, in der entwickelten Apparatur getestet zu werden. Wie schon im ersten dynamischen Modell von Ginski und Polli werden der Verwendung einer kombinierten, dynamischen Anlage vor allem dann Limitationen aufgezeigt, wenn es um die Untersuchung von BCS 2- bzw. 4-Substanzen und deren aufwändige Formulierungen geht (Ginski et al. 1999b). Durch die extremen Unterschiede zwischen Modell und humanem intestinalen Trakt kann die kleine zur Verfügung stehende Caco-2-Oberfläche keine oder nur eine begrenzte Korrelation zwischen in vitro und in vivo Daten bieten. Auch Versuche mit nur einem kleinen Teil der Formulierung, die an bestehende Literatur angelehnt sind (Buch et al. 2009), können keine Verbesserung der Korrelation herbeiführen. Lediglich die Verhältnisse der Freisetzung scheinen bei reduzierten Arzneistoff- und Puffer-Mengen besser abgebildet zu werden. Allerdings ist der eingesetzte Arzneistoff BIXX auf Grund seiner extrem schlechten Löslichkeitswerte ein gutes Beispiel für die Grenzen der Apparatur. Bedingt durch die niedrigen Konzentrationen im Donorkompartiment, diffundiert selbst bei dem mit über $1,5 \cdot 10^{-4}$ cm/s sehr hohen Permeationskoeffizient nur wenig Wirkstoff durch die Caco-2-Zellen. Zwar liegt der Grund für die niedrige Permeation nur zum Teil in der Konzentration auf Akzeptorseite, trotzdem war mit Einsatz der HPLC-MS eine Analytikmethode, die nicht zum Standardrepertoire der pharmazeutischen Technologie gehört, von Nöten. Dieser Umstand spricht gegen eine Routinenutzung des Modells. Bei solch geringen absoluten Konzentrationen sowohl apikal als auch basolateral, führen die großen relativen Schwankungen zu einer enormen Vorhersageungenauigkeit. Die Beispielrechnung in Abschnitt 3.2.1 (Tabelle 3-4) trifft jedoch trotzdem die experimentell bestimmten permeierten Mengen recht genau. Der Grund liegt jedoch vermutlich nicht in der niedrigen Konzentra-

tion des Stoffs auf apikaler Seite. Wahrscheinlicher ist der in Abschnitt 3.2.6.2 beschriebene Effekt, der zur Präzipitation des Wirkstoffs im Zellinneren führt.

So lautet das abschließende Fazit über die Versuche mit der dynamischen Caco-2-Apparatur, dass diese entsprechend der Anforderungen funktioniert und gut geeignet ist, solange die physiko-chemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Stoffe nicht zu extrem werden. Allerdings muss die Verwendbarkeit der Anlage bei der Entwicklung einer Substanz immer von Fall zu Fall betrachtet werden. Diese Einschätzung kann schon nach Fertigstellung der ersten Prototypen erfolgen. Wie in dieser Arbeit gezeigt, kann es durchaus sein, dass sich der Stoff bei Abwesenheit von Hilfsstoffen gut untersuchen lässt. Experimente mit Formulierungsprototypen können jedoch zu in vitro Daten führen, die durch die mangelhafte Vergleichbarkeit von in vitro mit in vivo Situation Effekte abbilden, die im menschlichen Körper so nicht eintreten.

3.3 Ergebnisse der SPE-Apparatur

Die Ergebnisse der dynamischen Caco-2-Apparatur beweisen, wie schwer es ist, biorelevante in vitro Modelle zu entwickeln, die ein detailliertes Bild der Absorption von Arzneistoffen im menschlichen Körper zeichnen können. Der Vorteil der Arbeit mit biologischem Material, dass auch aktive Prozesse abgebildet werden können, wird durch den Nachteil der begrenzten Zahl an apparativen und ablaufspezifischen Freiheitsgraden neutralisiert. Ein weiterer Nachteil ist die geringe Wirkstoffmenge, die durch den Caco-2-Monolayer aus dem Freisetzungskompartiment permeiert. Dadurch können Arzneiformen den enthaltenen Wirkstoff nur bis zum Erreichen der Sättigungskonzentration freisetzen und die freigesetzte Fraktion spiegelt die in vivo Situation nur unzureichend wieder. Als weitere Möglichkeit den freigesetzten Wirkstoff zu entfernen wird, neben organischer Schicht und Dialyse (Kapitel 1.5), die Festphasenextraktion (solid phase extraktion, SPE) identifiziert. Auf Basis dieser Technologie, bei der gelöster Wirkstoff auf einer mit einem Kieselgelderivat gefüllten Chromatographiesäule fixiert werden soll, wird in dieser Arbeit eine völlig neuartige Apparatur aufgebaut. Das entwickelte SPE-Modell bietet dementsprechend hohes Potential, da die zur Verfügung stehenden Stellschrauben, wie Veränderung der Eliminationsgeschwindigkeit und Veränderung des Versuchs-pHs über den gesamten physiologisch relevanten Bereich, eine biorelevante Abbildung der intestinalen Verhältnisse ermöglichen und somit, trotz der Einfachheit des Aufbaus, exakte Aussagen über das in vivo Verhalten der Arzneiformen getroffen werden können.

3.3.1 Aufbau der SPE-Apparatur

Der schematische Aufbau der neuen Apparatur wird durch Abbildung 3-17 gezeigt:

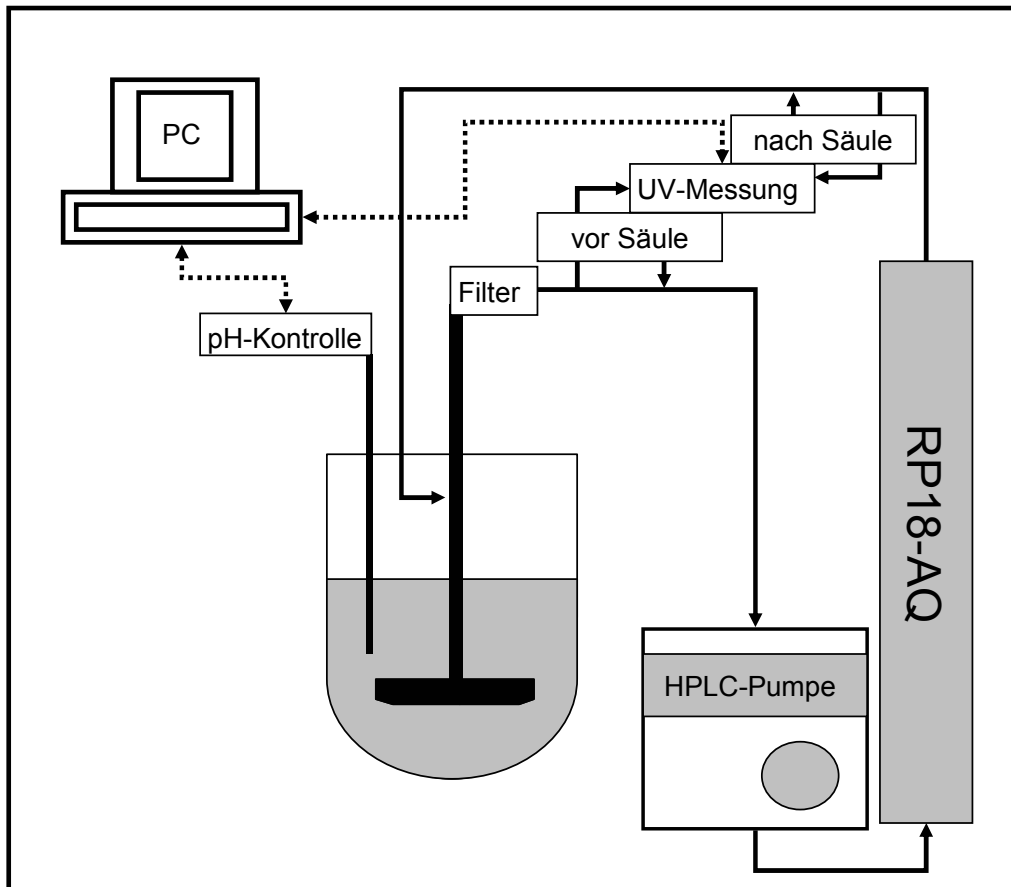


Abbildung 3-17: Schematischer Aufbau der SPE-Apparatur. Gestrichelte Pfeile: Verbindungen zwischen PC und UV-Gerät bzw. Titrator; durchgezogene Pfeile: Flüssigkeitsstrom

Das System besteht aus einem Freisetzungsapparat von Sotax (AT7), in den ein Vessel für die Freisetzung und eines für reinen Puffer (zur permanenten Bestimmung des Nullwertes) eingesetzt werden. Aus dem Freisetzungsvessel wird mittels einer HPLC-Pumpe (YMC Europe, KD50/400 SS) das Freisetzungsmedium über eine semipräparative Säule (Kronlab eco^{plus}, Innendurchmesser 50 mm, Länge 500 mm) im Kreislauf gepumpt. In der Säule wird der Wirkstoff auf dem enthaltenen Kieselgel zurückgehalten, wodurch dem Freisetzungsvessel ständig aufgereinigtes und wirkstofffreies Freisetzungsmedium zugeführt wird. Überträgt man die Entfernung des Wirkstoffs aus dem Freisetzungsmedium auf die *in vivo* Situation entspricht dieser Schritt der Absorption des Wirkstoffs aus dem Intestinum.

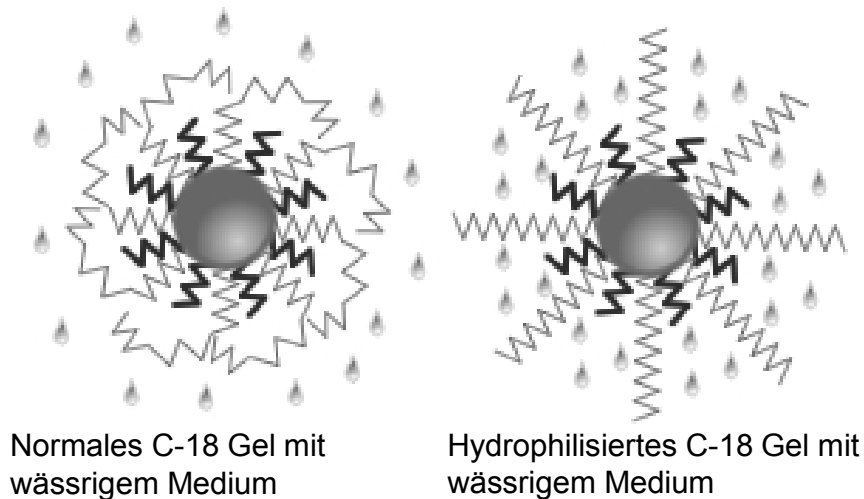
3 Ergebnisse



Abbildung 3-18: SPE-Apparatur

Die semipräparative Säule ist mit einem Kieselgelderivat gefüllt, das den Einsatz rein wässriger Puffer erlaubt und trotzdem zur Bindung lipophiler Substanzen in der Lage ist. Die Dimensionen der Säule sind so gewählt, dass die gesamte Dosis einer Arzneiform aufgenommen werden kann und auch über die gesamte Versuchsdauer auf der Säule verbleibt. Die Modifikationen der Silanolgruppen erfolgt bei dem verwendeten Gelyp einerseits über C18-Gruppen zur Bindung der ungeladenen Substanzen und andererseits durch polare Gruppen, die bei Einsatz der wässrigen Medien dafür sorgen, dass die C18-Gruppen nicht kollabieren (Abbildung 3-19). Eine weitere Bedeutung kommt den hydrophilen Gruppen dadurch zu, dass sie auch polare Moleküle, wie organische Säuren oder Vitamine binden (persönliche Kommunikation mit Britta Blödorn; technische Leiterin bei YMC Europe).

Der Hersteller YMC bietet das Gel unter dem Namen ODS-AQ dementsprechend zur Trennung von sowohl lipophilen Stoffen (wie dem verwendeten Arzneistoff), als auch von sehr polaren Stoffen (wie wasserlöslichen Vitaminen oder geladenen Molekülen) an.



Normales C-18 Gel mit wässrigem Medium

Hydrophilisiertes C-18 Gel mit wässrigem Medium

Abbildung 3-19: Verwendung des Gels mit wässrigen Puffern (www.ymc-europe.com)

Um die Konzentration des Arzneistoffs im Freisetzungsgefäß und das vollständige Verbleiben des Wirkstoffs auf der Säule zu messen, wird sowohl vor als auch nach der Säule die Konzentration des Stoffs über UV-Messung (Agilent, DAD-Gerät 8543) bestimmt. Die Messung findet jeweils im drucklosen Teil der Apparatur statt, um Beschädigungen der im DAD-Gerät verwendeten Küvetten durch zu hohen Druck zu verhindern.

Sämtliche verbaute Schläuche sind aus Teflon und besitzen einen Außendurchmesser von 3 mm bei einem Innendurchmesser von 2,25 mm. Lediglich die Schläuche, die zum DAD-Gerät und wieder zurück führen sind mit einem inneren Durchmesser von 0,8 mm deutlich dünner, um das Totvolumen der Messloops zu reduzieren.

Als weiteres Modul der Anlage ist ein automatisierter Titrator (Mettler Titrando) in das System integriert. Dieser ermöglicht Kontrolle und Veränderung des pH-Wertes im Freisetzungsmedium über die Versuchsdauer bzw. zu bestimmten Zeiten des Experiments.

Entsprechend dem beschriebenen Aufbau ergeben sich für die Methodenentwicklung die Möglichkeiten, einerseits durch Änderung der Pumpgeschwindigkeit und andererseits durch Erhöhung des pH-Wertes die Magen-Darm-Passage einer Arzneiform detailliert durch in vitro Versuche abzubilden und zu beschreiben.

3.3.2 Ermittlung der optimalen hardwareseitigen Parameter

Ein Ziel bei der Entwicklung einer neuartigen Apparatur muss stets die Gewinnung von reproduzierbaren Daten sein. Dazu muss der apparative Aufbau so gewählt werden, dass der Einfluss von Änderungen am Versuchsablauf auf die Reproduzierbarkeit nicht durch hardwareseitige Schwankungen kaschiert wird. Bei Vergleichen mit klassischen Freisetzungsmethoden werden Vesselgröße und Rührgeschwindigkeit als Einflussparameter auf die Freisetzungskinetik identifiziert. Deswegen wird in einem ersten Schritt bei konstanten Pumpgeschwindigkeiten und damit konstanten Eliminationskonstanten der Einfluss dieser beiden Größen charakterisiert. Um das so genannte Coning, also die Bildung von Kegeln von Pulvern oder einzelnen Partikeln multipartikulärer Arzneiformen zu verhindern, werden nur Vessel verwendet, die mit einer kleinen Erhöhung („Peak“) im Zentrum des Vesselbodens versehen sind. Dadurch wird eine gleichmäßigere Durchmischung und bessere Hydrodynamik im gesamten Vessel erreicht und weniger durchströmte Bereiche vermieden.

Obwohl die Pumpgeschwindigkeit bei diesen Versuchen konstant bei 100 ml/min ist, ergeben sich je nach Vesselgröße unterschiedliche Eliminationskonstanten gemäß Gleichung 3-1.

$$k_{el} = \frac{\text{Pumpgeschwindigkeit}}{\text{Vesselgröße}}$$

Gleichung 3-1: Eliminationskonstante im SPE-Modell

Der Wert der Eliminationskonstanten entspricht damit dem Anteil des im Freisetzungsgefäß enthaltenen Mediums, das pro Minute aus dem Vessel gepumpt wird und dementsprechend dem Anteil des im Gefäß befindlichen Wirkstoffs, der pro Minute aus dem Freisetzungskompartiment entfernt wird. Die Eliminationskonstante beträgt nach Gleichung 3-1 bei einer Pumprate von 100ml/min in Versuchen mit 250 ml Vessel $0,4 \text{ min}^{-1}$ bzw. $0,111 \text{ min}^{-1}$ in Versuchen mit 900 ml Vesseln. Die Unterschiede, die sich durch Vesselgröße und Pumpgeschwindigkeit ergeben, sind in Abbildung 3-20 dargestellt.

3 Ergebnisse

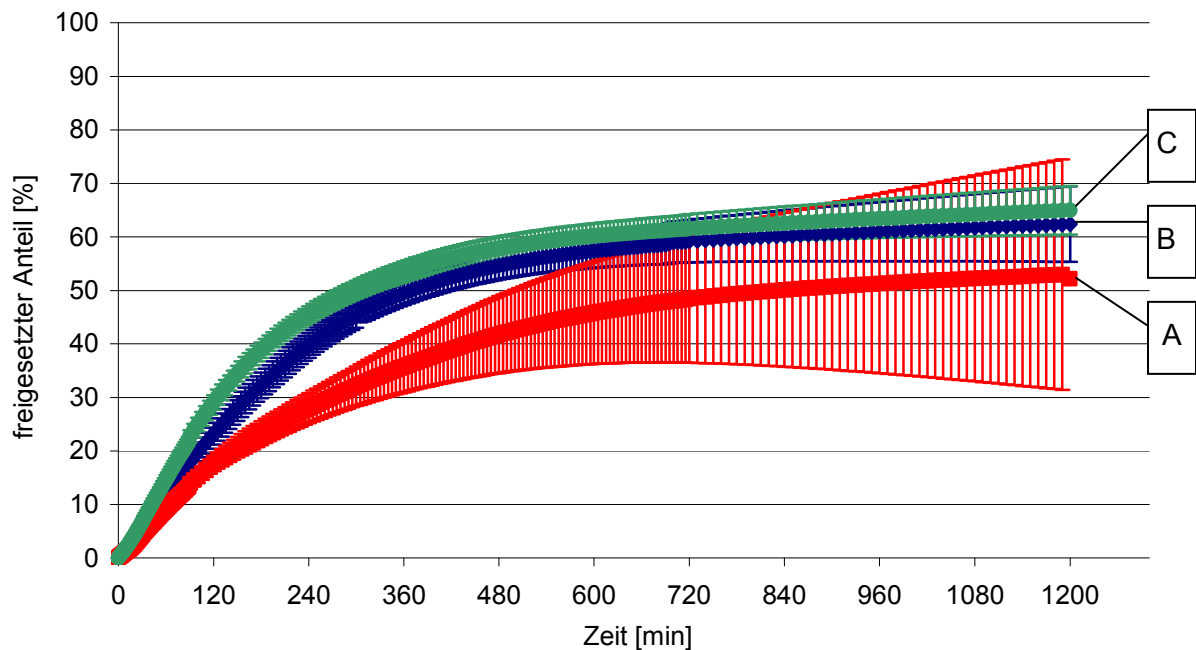


Abbildung 3-20: Vergleich der Vesselgrößen und Rührgeschwindigkeiten bei einer Pumpgeschwindigkeit von 100 ml/min: A: 50 UpM / 250 ml Vessel; B: 100 UpM / 250 ml Vessel; C: 150 UpM / 900 ml Vessel [n=3 ± 95 % KI]

Die gemittelten Endfreigaben liegen mit Werten von 52, 62 und 65 % in einem engen Bereich. Allerdings ergeben sich für die Versuche im kleineren 250 ml Vessel deutlich größere Vertrauensbereiche, weswegen das 900 ml Vessel und eine Rührrate von 150 UpM für alle zukünftigen Versuche als Standard festgesetzt werden.

Obwohl sich die Eliminationskonstanten (nach Gleichung 3-1) deutlich voneinander unterscheiden, sind Freisetzungsverlauf und Endfreigaben trotz der unterschiedlichen Vesselgrößen sehr ähnlich. Daraus ergibt sich, dass nicht die Eliminationskonstante sondern die Pumpgeschwindigkeit der maßgebliche Faktor bei Freisetzungen mit der SPE-Apparatur ist.

3.3.3 Vergleiche unterschiedlicher Pumpgeschwindigkeiten

Der Einfluss der Pumpgeschwindigkeit auf die Endfreigabe von Arzneiform E und der Unterschied der Freigabe im Vergleich zur Standard USP 2-Anlage wird durch Abbildung 3-21 verdeutlicht.

Dabei zeigt sich, dass bei höheren Pumpgeschwindigkeiten höhere Endfreigaben erreicht werden können. Allerdings ergeben sich für Arzneiform E auch in einer Paddle-Apparatur relativ hohe Freigaben, die sich in Verlauf und Endwert nicht von Freisetzungen mit der SPE-Apparatur bei mittleren Pumpgeschwindigkeiten von 10 bzw. 30 ml/min unterscheiden. Der Hauptgrund für die gute Performance der Formulierung unter Standardbedingungen ist die in der Formulierung enthaltene Säure, die den pH-Wert des Freigabemediums von 5,5 auf

3 Ergebnisse

einen Wert von 4,1 absenkt. Dadurch wird die Sättigungslöslichkeit von BIXX deutlich erhöht. Im SPE-Modell wird der pH-Wert ebenfalls auf 4,4 reduziert. Der Unterschied in den End-pHs ist durch das um ca. 300 ml höhere Puffervolumen erklärbar, welches sich in der Säule und den Schläuchen befindet (vgl. Kapitel 3.3.4).

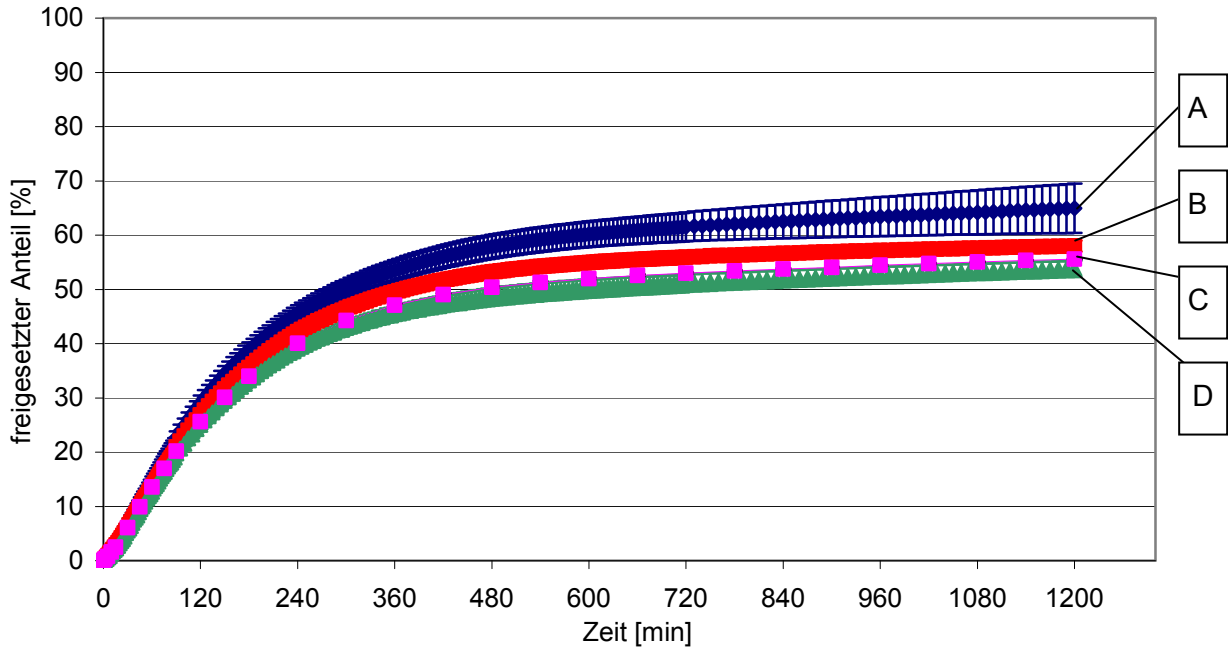


Abbildung 3-21: Arzneiform E: Vergleich unterschiedlicher Pumpgeschwindigkeiten und der USP 2-Apparatur. A: 100 ml/min; B: 30 ml/min; D: 10 ml/min; C: Paddle-Apparatur [n=3 ± 95 % KI]

Zur Überprüfung bzw. Bestätigung der Ergebnisse des Vergleichs der Pumpgeschwindigkeiten und der Sotax-Apparatur wird der gleiche Versuch mit Arzneiform A durchgeführt (Abbildung 3-22). Die Aussage, dass durch Erhöhung der Pumpgeschwindigkeit höhere Endfreigaben erreicht werden können, wird durch diese Versuchsreihen bestätigt. Ebenso der Trend zu unterschiedlicher Varianz bei unterschiedlichen Pumpraten mit einem Minimum bei mittleren Eliminationskonstanten.

Bei diesen Versuchsreihen erzielt die Arzneiform bei einem pH-Wert von 5,5 in der Sotax-Apparatur deutlich geringere Freigaben als im SPE-Modell, da sich bei diesem Prototypen aufgrund des Formulierungsansatzes kein Einfluss auf den pH-Wert ergibt. Bei 100 ml/min werden fast 90 % des enthaltenen Wirkstoffs freigesetzt. Dieser Wert ist sechs Mal so groß wie der in einer USP-2-Apparatur, bei ansonsten gleichen Bedingungen, erreichte Wert. Dies ist wie bereits erwähnt durch das Formulierungsprinzip zu erklären, das ohne pH-Modifikation auskommen soll. Erst bei einer Absenkung des pH-Wertes in der Paddle-Apparatur auf einen pH-Wert von 4,5 nähert sich die Freigabekurve wieder derjenigen der SPE-Apparatur an, da sich bei niedrigeren pH-Werten deutlich mehr Wirkstoff lösen kann.

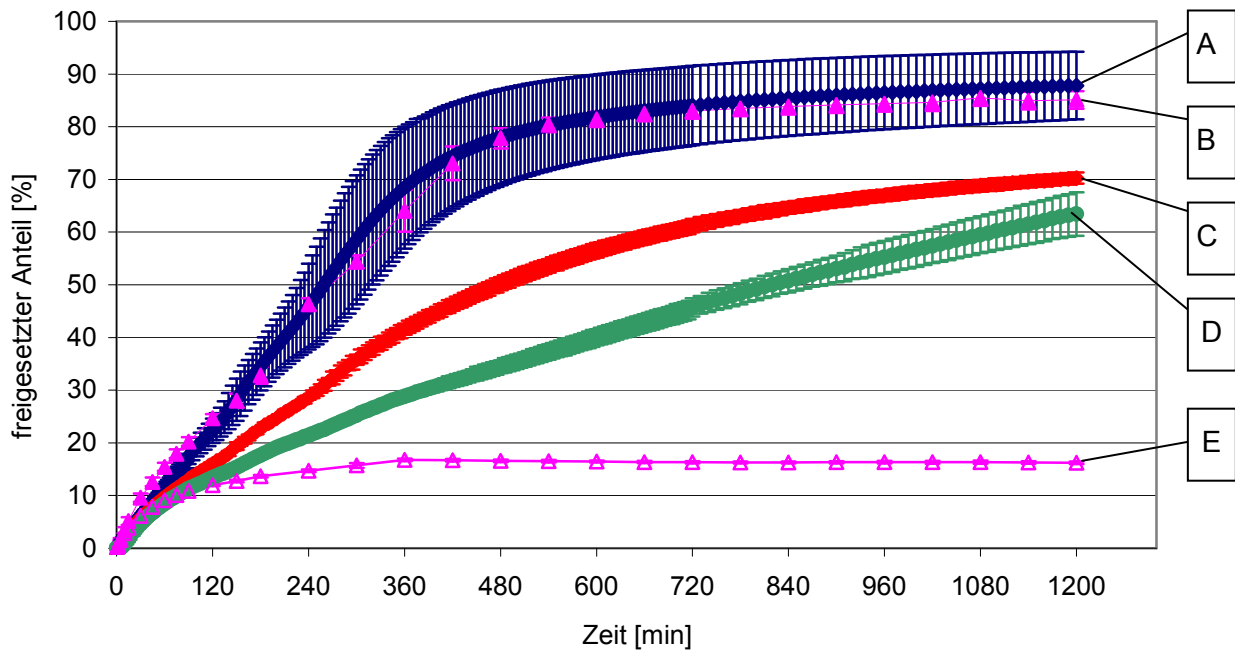


Abbildung 3-22: Arzneiform A: Vergleich unterschiedlicher Pumpgeschwindigkeiten und der USP 2-Apparatur. A: 100 ml/min; C: 10 ml/min; D: 4 ml/min; B: Paddle pH 4,5; E: Paddle pH 5,5 ($n=3 \pm 95\%$ KI)

Die Experimente mit diesen beiden Arzneiformen beweisen die Tauglichkeit der Anlage für pH-abhängig schwer-wasserlösliche Wirkstoffe. Die Apparatur ermöglicht hohe Endfreigaben selbst bei für den Wirkstoff sonst ungünstigen pH-Werten. Das Ausmaß der Endfreigaben kann durch Änderung der Pumpgeschwindigkeit zusätzlich beeinflusst werden.

3.3.4 Verhalten von pH-Modifikatoren im SPE-Modell

Zur Überprüfung des Verhaltens der dissoziierten Protonen wird der in Kapitel 2.3.3 erklärte Versuch durchgeführt. Auf eine Untersuchung zum Verhalten der weiteren Hilfsstoffe wird nach Kommunikation mit dem Hersteller des Säulenmaterials verzichtet. Laut dessen Angaben werden z.B. sowohl Säureanionen als auch Polymere durch das Gel zurückgehalten. Das bedeutet, dass die in der Formulierung enthaltenen Hilfsstoffe ihre Funktion nur so lange aufrechterhalten können, wie sie im Freisetzungsgefäß verbleiben. So könnte es zum Beispiel sein, dass durch Entfernung der Übersättigungshilfsstoffe die maximal zu erreichende Konzentration des Wirkstoffs reduziert wird..

Die zugegebene Weinsäure löst sich im Puffer sofort auf und führt zu einer Absenkung des pH-Wertes auf 4,1 (Abbildung 3-23). Dieser Wert entspricht demjenigen, den Arzneiform E bei Freigabeversuchen in der Standard-Apparatur erreicht (Abschnitt 3.3.3). Durch die Verdünnung mit Puffer aus dem Totvolumen der Apparatur steigt der pH-Wert wieder an.

Nach zehn Minuten stellt sich ein Gleichgewicht bei pH 4,4 ein. Dies entspricht dem pH-Wert, der sich auch bei Freisetzungen von Arzneiform E in der SPE-Apparatur ergibt.

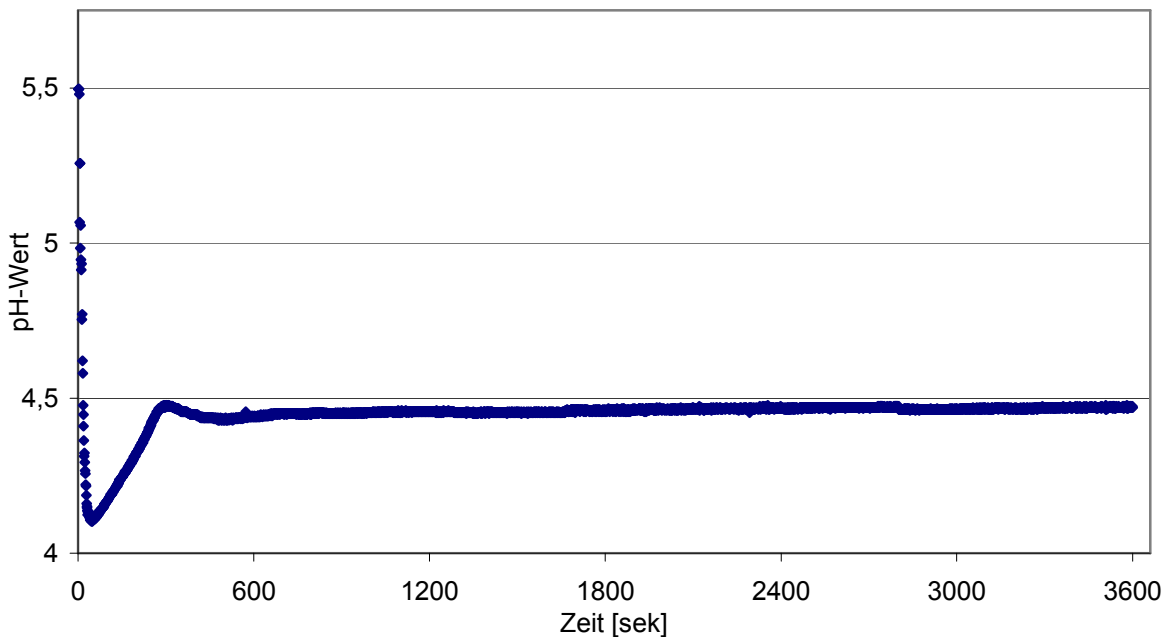


Abbildung 3-23: Verlauf des pH-Wertes nach Zugabe von 240 mg Weinsäure zu 900 ml Puffer [n=3]

Die Pumpgeschwindigkeit ist bei diesem Versuch auf 100 ml/min eingestellt, das Totvolumen der Apparatur beträgt ca. 300 ml. Daraus ergibt sich, dass in den zehn Minuten bis zur Einstellung des Gleichgewichtes ein Liter im Kreislauf gepumpt wird. Dementsprechend genügt ein einmaliges Umpumpen des kompletten Freisetzungskompartmentes, um eine vollständige Durchmischung und damit bei Stoffen, die nicht auf der Säule zurück gehalten werden, einen Gleichgewichtszustand zu erreichen.

3.3.5 Verbesserung der Biorelevanz

Die bisher gezeigten Ergebnisse ermöglichen noch keine Vergleiche mit den vorhandenen Humandaten. Erst durch direkten Vergleich mit den dekonvolutionierten Daten aus der Phase I-Studie wird ersichtlich, dass die bisher getestete Geschwindigkeit von 10 ml/min die in vivo Situation dieser Formulierung in weiten Teilen gut abbilden kann (Abbildung 3-24). In allen zukünftigen Abbildungen wird die Zeit-Achse der in vivo Daten mit dem in Kapitel 1.8 eingeführten Faktor 4,8 verrechnet. Dieser ermöglicht es, die in vivo Daten im gleichen Diagramm und im gleichen Maßstab, wie die in vitro Daten zu betrachten.

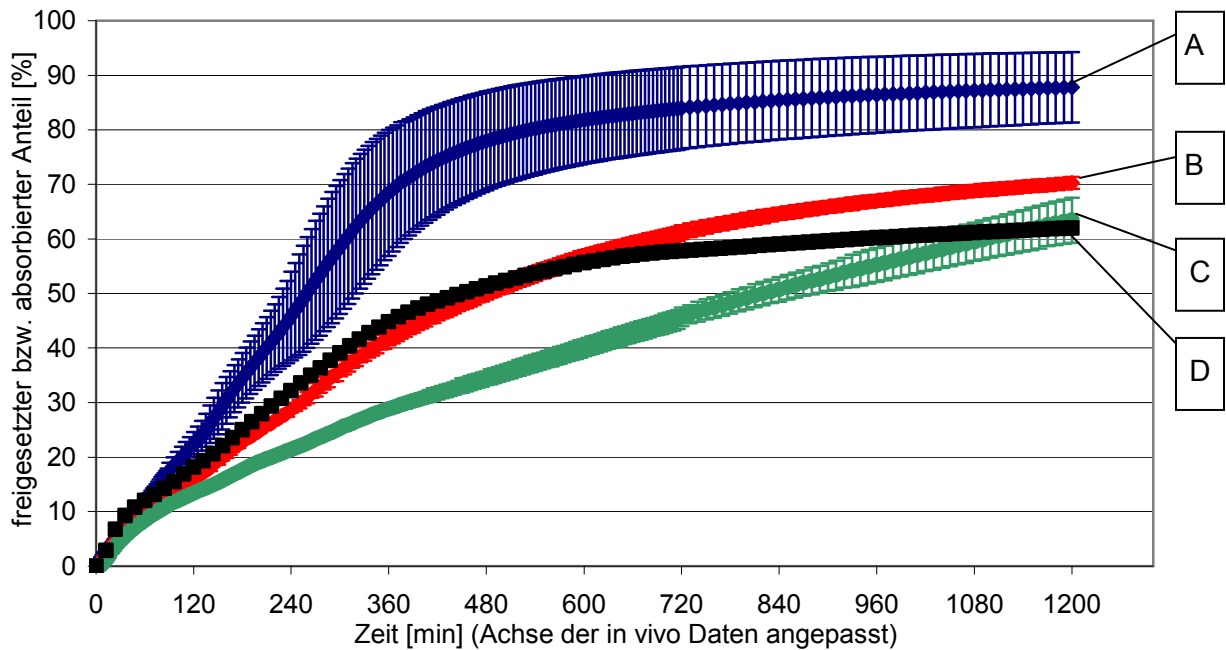


Abbildung 3-24: Formulierung A: Vergleich der Freisetzungen mit festen Pumpgeschwindigkeiten mit der Absorptionskurve der Arzneiform. A: 100 ml/min; B: 10 ml/min; C: 4 ml/min; D: in vivo Situation [n=3 ± 95 % KI]

3.3.5.1 Verwendung von Pumpprogrammen

Um das Verhalten der Formulierungen im gastrointestinalen Trakt besser simulieren zu können wird mit verschiedenen Pumpprogrammen, das heißt Änderungen der Pumpgeschwindigkeit zu bestimmten Zeitpunkten des Versuchs, getestet, ob sich die Freisetzungskurve besser an den Verlauf der Absorptionskurve annähern lässt. Da die Versuchsdauer mit insgesamt 24 h (incl. Bestimmung der Wiederfindung, Reinigung der Säule und Re-Äquilibrierung des Systems) sehr hoch ist, wird die Zahl der Wiederholungen auf zwei beschränkt. In Abbildung 3-25 ist eine Auswahl der untersuchten Programme abgebildet. Die Beschreibung der zeitlichen Abläufe und der jeweils eingestellten Pumpgeschwindigkeiten ist in Tabelle 3-9 notiert. Die Veränderungen und letztendlich gewählten Parameter haben zu diesem Zeitpunkt der Methodenentwicklung allerdings keinen Bezug zur in vivo Situation. Es wird lediglich versucht durch hohe Pumpgeschwindigkeiten steile Abschnitte der in vivo Kurve abzubilden, während niedrige Pumpraten flache Abschnitte abbilden sollen.

3 Ergebnisse

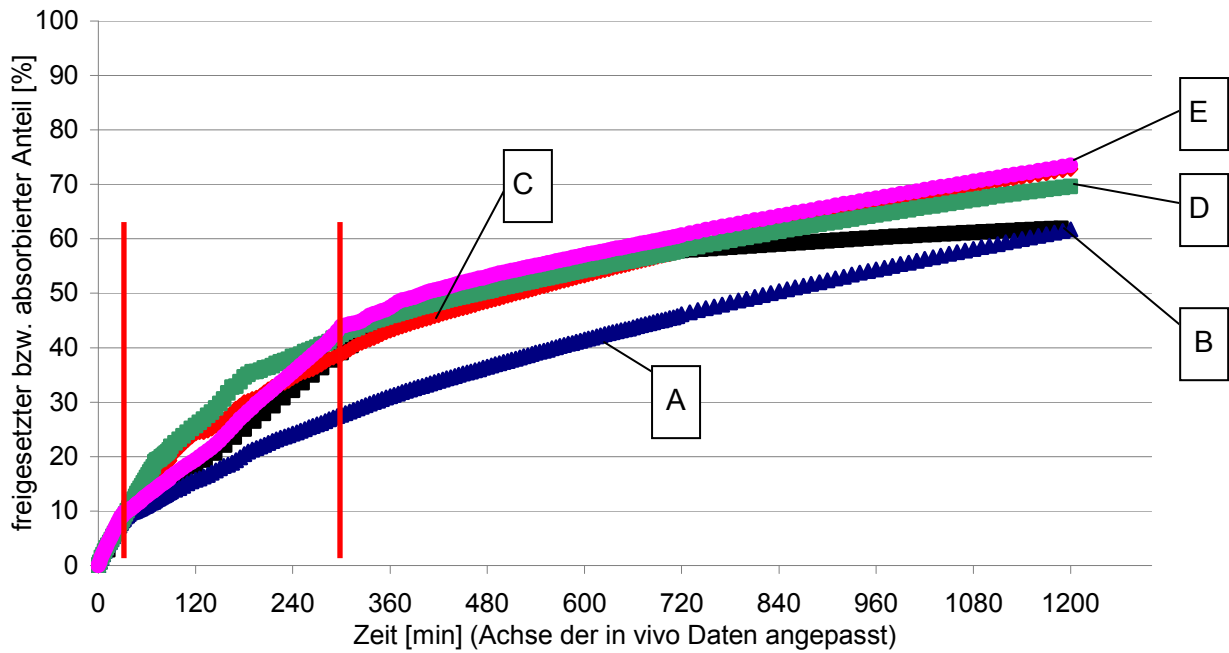


Abbildung 3-25: Arzneiform A: Vergleich unterschiedlicher Pumpprogramme bei pH 5,5; B: in vivo Absorptionskurve; senkrechte Linien: Wechsel der Pumpgeschwindigkeit bei Freisetzungskurve E [n=2]

A		C		D		E	
min	ml/min	min	ml/min	min	ml/min	min	ml/min
30	250	60	120	60	150	30	150
Rest	4	60	100	120	50	270	25
		60	10	Rest	5	Rest	4
		Rest	4				

Tabelle 3-9: Pumpprogramme Arzneiform A bei pH 5,5

Es wird deutlich, dass durch den Einsatz von Pumpprogrammen eine weitere Annäherung der Freisetzungskurve an die in vivo Situation erzielt werden kann. Allerdings gelingt es nicht, die Freisetzung gegen Ende der Versuche so weit zu reduzieren, dass Steigungen resultieren, die denen der in vivo Kurve entsprechen. Dies ist der apparativen Konfiguration der Anlage geschuldet: Eine weitere Reduktion der Pumpgeschwindigkeit, die in reduzierter Freisetzung resultieren müsste, unter die hier eingestellten 4 ml/min ist auf Grund des an der Pumpe einstellbaren Bereichs nicht möglich.

Trotzdem bildet Kurve E die Verhältnisse im Körper zu diesem Zeitpunkt der Methodenentwicklung zufrieden stellend ab. Zur Überprüfung der Tauglichkeit der gefundenen Methode wird Arzneiform B mit dieser freigesetzt.

3 Ergebnisse

Dabei zeigt sich, dass bei pH 5,5 die Freisetzung über die gesamte Versuchsdauer auf Grund des Formulierungsansatzes deutlich unter der Absorptionkurve verläuft. Erst in Versuchen bei einem pH-Wert von 6,0 wird der magensaftresistente Lack aufgelöst und die in der Formulierung enthaltene Säure kann nach ihrer Freisetzung den pH-Wert im Vessel ansenken, was in deutlich erhöhter Freisetzung des Wirkstoffs resultiert (Abbildung 3-26).

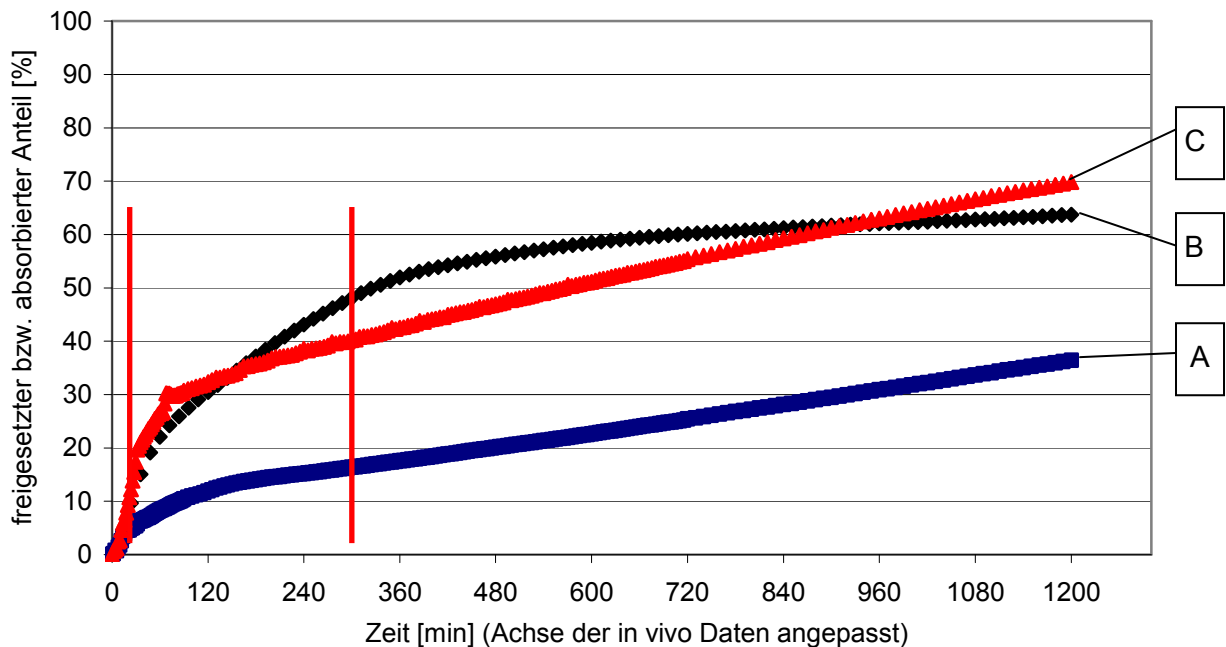


Abbildung 3-26: Arzneiform B: Freisetzung mit in Tabelle 1 festgelegtem Pumpprogramm. A: Freisetzung bei pH 5,5; C: Freisetzung bei pH 6; B: in vivo Absorption; senkrechte Linien: Wechsel der Pumpgeschwindigkeit $e [n=2]$

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Freisetzung von BIXX aus Arzneiform A zu verifizieren, wird der mit Arzneiform B durchgeführte Versuch an der Matrixtablette bei pH 6 wiederholt. Die Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 3-27, belegen jedoch, dass die Freisetzung bei pH 6 auf einem deutlich reduzierten Niveau abläuft und die bei pH 5,5 erreichten Endfreigaben deutlich unterschritten werden. Der Grund für dieses Verhalten ist die Abwesenheit eines pH-Modifikators in der Matrixtablette.

Da das Ziel der Entwicklung jedoch eine Methode ist, die für möglichst viele Formulierungen Gültigkeit besitzt, wird als zusätzlicher Kontrollparameter ein automatischer Titrator in das Modell integriert. Durch diesen wird es möglich, zusätzlich zu Veränderungen in der Pumpgeschwindigkeit und damit der Elimination aus dem Freigabefäß, den Verlauf des pH-Wertes über die Versuchsdauer zu verändern. Es wird erwartet, dass durch diese Erweiterung auch Arzneiformen, die über pH-sensitive Formulierungsmechanismen verfügen, deutlich biorelevanter freigesetzt werden können.

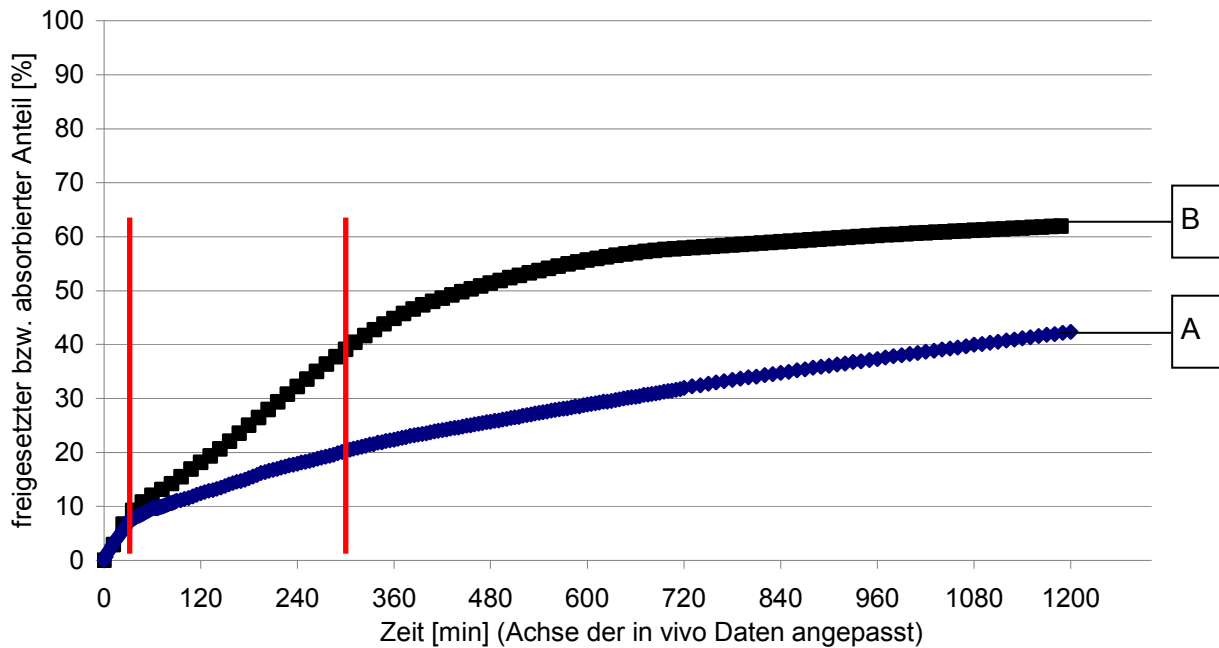


Abbildung 3-27: Arzneiform B: Freisetzung mit Pumpprogramm bei pH 6. A: in vitro Freisetzung; schwarz: in vivo Absorption; senkrechte Linien: Wechsel der Pumpgeschwindigkeit [n=2]

3.3.5.2 Verwendung von pH-Programmen

Im vorhergehenden Abschnitt wird gezeigt, dass auf Grund der unterschiedlichen Formulierungsansätze ein weiterer Kontrollparameter im SPE-Modell nötig ist, um eine Methode zu erstellen, die für alle Prototypen ein hohes Maß an Korrelation zwischen den in vivo und in vitro Daten bietet.

Unterschiede in den einzelnen Methoden finden sich in der Stärke der zur Einstellung zugesetzten Natronlauge und damit in der Geschwindigkeit der pH-Einstellung und in der Zahl der weiteren pH-Anpassungen und dem eingestellten End-pH. Von Beginn an wird das Hauptaugenmerk auf einen biorelevanten, das heißt in diesem Fall, dem menschlichen Körper nachempfundenen pH-Verlauf gelegt (Tabelle 3-10, Kapitel 1.1.3). Die Methode, deren Freisetzungsprofil die in vivo Situation am besten abbilden kann, ist am Ende dieser Versuche auch diejenige, bei der der pH-Verlauf im gastrointestinalen Trakt am exaktesten nachgebildet wird. Im Verlauf der Versuche wird auch das Pumpprogramm weiter modifiziert und dabei die Pumprate zum Ende des Versuchs von bisher 4 ml/min auf 10 ml/min erhöht.

Der Versuch mit der letztendlich entwickelten Methode wird drei Mal wiederholt, auf eine Abbildung der Fehlerindikatoren wird jedoch zu Gunsten der Übersichtlichkeit verzichtet. Das Konfidenzintervall beträgt jedoch beim letzten Wert lediglich 2,91 und liegt damit in einem äußerst engen Bereich (Abbildung 3-28 und Tabelle 3-10).

3 Ergebnisse

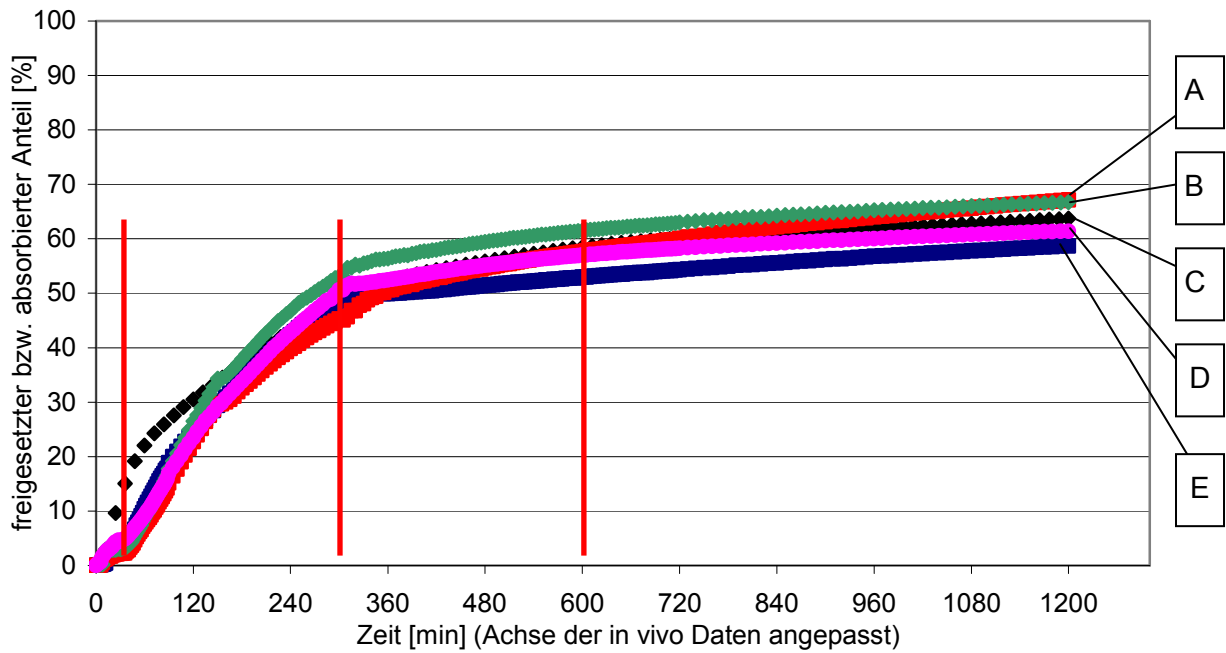


Abbildung 3-28: Arzneiform B: Freisetzungsprofile bei unterschiedlichen pH-Verläufen. C: in vivo Absorption; senkrechte Linien: Zeitpunkte der Änderungen von Pumpgeschwindigkeit und pH-Wert [A, B, E: n=2; D n=3]

A		B		D		E	
Zeit [min]	pH	Zeit [min]	pH	Zeit [min]	pH	Zeit [min]	pH
Pumpe	Molarität	Pumpe	Molarität	Pumpe	Molarität	Pumpe	Molarität
[ml/min]	NaOH	[ml/min]	NaOH	[ml/min]	NaOH	[ml/min]	NaOH
30	3	30	3	30	3	30	3
150		150		150		150	
120	5,75	120	5,75	120	5,55	120	5,55
25	1	25	1	25	4	25	4
150	5,75	150	5,75	150	5,55	150	5,55
25	1	25	1	25	4	25	4
Rest	6,8	Rest	6,3	Rest	6,3	300	6,3
4	1	10	1	10	4	10	4
						Rest	6,8
						10	4

Tabelle 3-10: Arzneiform B: Unterschiedliche Pump- und pH-Programme während der Methodenentwicklung

3 Ergebnisse

Die Unterschiede zwischen der Freisetzungskurve und der Absorptionskurve nach der ersten Anhebung von pH-Wert und Pumpgeschwindigkeit nach 30 Minuten können dadurch erklärt werden, dass sich der Lack in vitro nur langsam auflöst. Erst nach dessen Auflösung startet die Säurefreisetzung, wodurch der pH auf einen Wert absinkt, in dem BIXX in höheren Mengen löslich ist und damit freigesetzt werden kann. Dieser Umstand ist jedoch als Nachteil einer forcierten Abbildung der in vivo Verhältnisse in Kauf zu nehmen und bewegt sich in einem akzeptablen Rahmen.

Als Gegenteil für die erzielten Ergebnisse, wird die bisher entwickelte Methode erneut auf die Matrixtablette übertragen (Abbildung 3-29 und Tabelle 3-11).

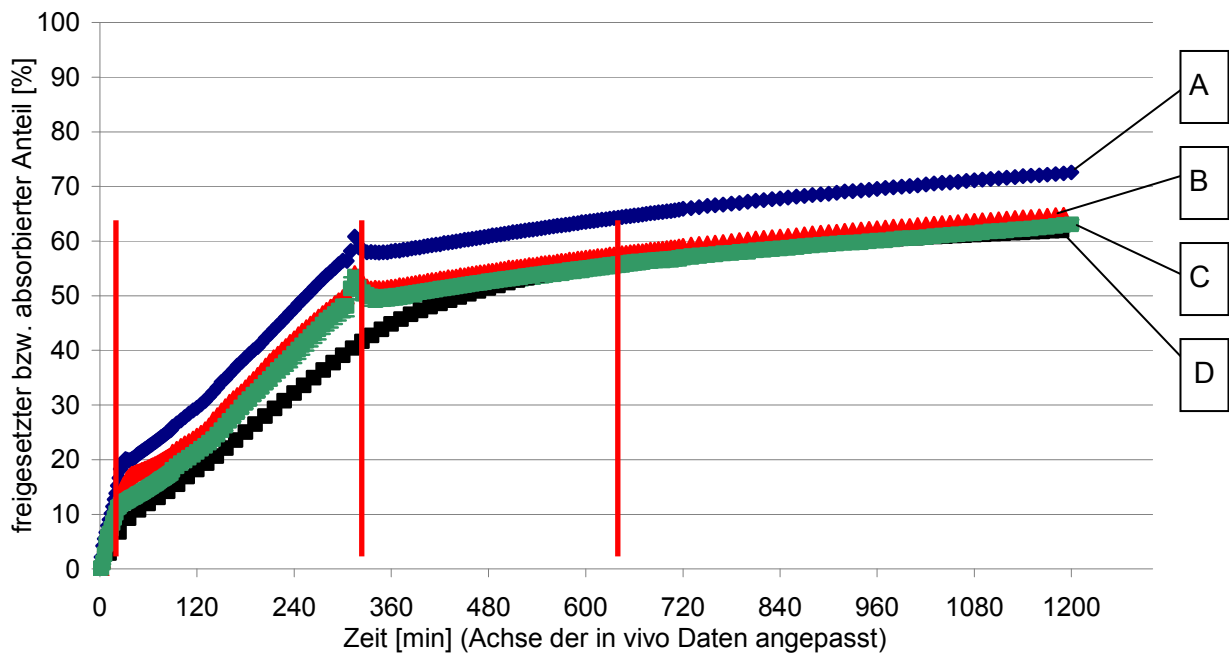


Abbildung 3-29: Arzneiform A: Freisetzung bei unterschiedlichen pH-Verläufen. D: in vivo Absorptionskurve; senkrechte Linien: Zeitpunkte der Änderungen von Pumpgeschwindigkeit und pH-Wert [A, B: n=2; C n=3 ± 95 % KI]

Durch den niedrigen pH-Wert am Anfang der Experimente wird bei der gewählten Pumpgeschwindigkeit zuviel BIXX freigesetzt, um die Absorptionskurve zu treffen (Abbildung 3-29 Kurve A). Dieser schnelle Anstieg der Freisetzungskurve erfordert ein erneutes Anpassen der Methode (Tabelle 3-11; Abbildung 3-29 Kurven B und C). Dabei werden die Absorptionsverhältnisse im gastrointestinalen Trakt nochmals exakter nachgebildet und die simulierten Transitzeiten an die in vivo Situation angepasst: Die ersten 20 Minuten bei pH 3 und der langsamen Pumpgeschwindigkeit von lediglich 10 ml/min simulieren den Aufenthalt der Formulierungen im Magen. Die darauf folgenden 2,5 Stunden bei angehobenen pH-Wert von 5,5 und deutlich höherer Pumpgeschwindigkeit entsprechen der Passage des Dünndarms. In der letzten Phase, bei der der pH-Wert erst auf 6,3 und dann auf 6,8 eingestellt wird und die

3 Ergebnisse

Pumpgeschwindigkeit erneut reduziert wird, simulieren den Aufenthalt der Arzneiformen im Dickdarm.

Der kleine Peak nach einer Versuchsdauer von 5 h ergibt sich aus dem gleichen Phänomen, das bei Versuchen mit der Caco-2-Apparatur mit dieser Formulierung auftritt. Sobald der pH einen Wert von 6 überschreitet, quillt die Matrix so stark an, dass sie desintegriert und kurzfristig viel BIXX im Freisetzungsmedium gelöst wird. Der Wirkstoff wird jedoch zum einen durch die Pumpe entfernt und fällt zum anderen aus, was an einer schwachen Trübung des Freisetzungsmediums erkennbar ist.

A		B		C	
Zeit [min]	pH	Zeit [min]	pH	Zeit [min]	pH
Pumpe	Molarität	Pumpe	Molarität	Pumpe	Molarität
[ml/min]	NaOH	[ml/min]	NaOH	[ml/min]	NaOH
30	3	30	3	20	3
150		10		10	
120	5,55	120	5,55	130	5,55
25	4	25	4	25	4
150	5,55	150	5,55	150	5,55
25	4	25	4	25	4
300	6,3	300	6,3	300	6,3
10	4	10	4	10	4
Rest	6,8	Rest	6,8	Rest	6,8
10	4	10	4	10	4

Tabelle 3-11: Arzneiform A: Unterschiedliche Pump- und pH-Programme während der Methodenentwicklung

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der Methode auf die anderen Arzneiformen werden diese ebenfalls unter Verwendung der Methode freigesetzt. Die gewonnene Freisetzungskurve für Arzneiform B ist, mit Ausnahme des Beginns, ebenfalls sehr nahe an der in vivo Situation (Abbildung 3-30). Das Gleiche gilt für Arzneiform C (Abbildung 3-31).

3 Ergebnisse

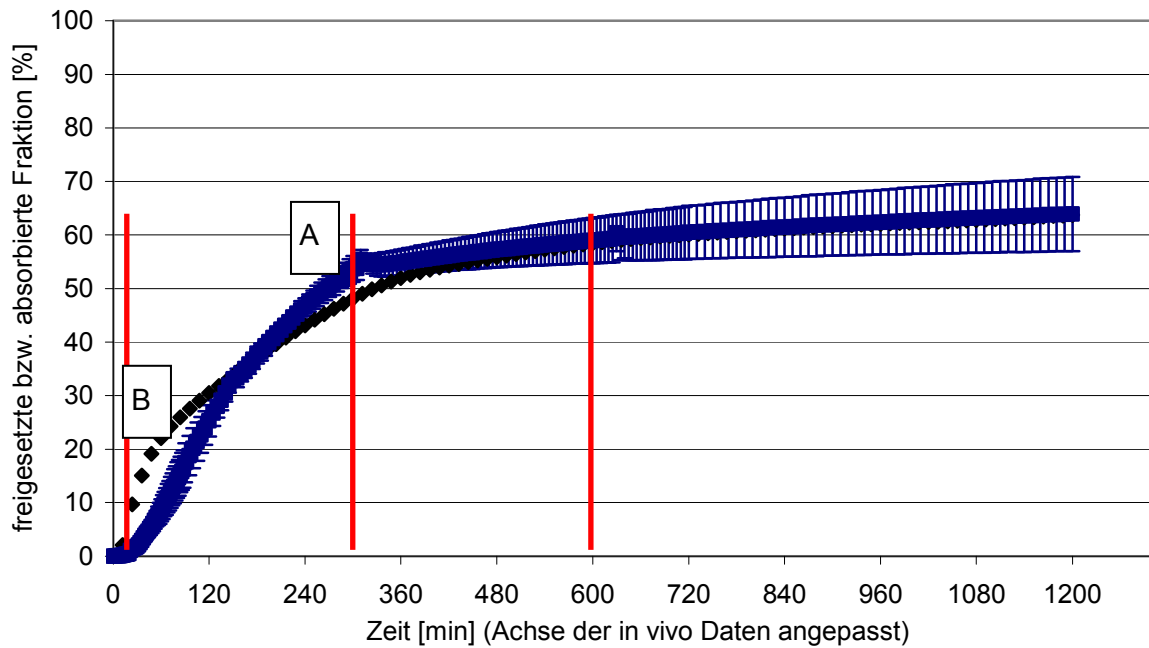


Abbildung 3-30: Arzneiform B: A: in vitro Freisetzung; B: in vivo Absorptionskurve; senkrechte Linien: Zeitpunkte der Änderungen von Pumpgeschwindigkeit und pH-Wert [n=3 ± 95 % KI]

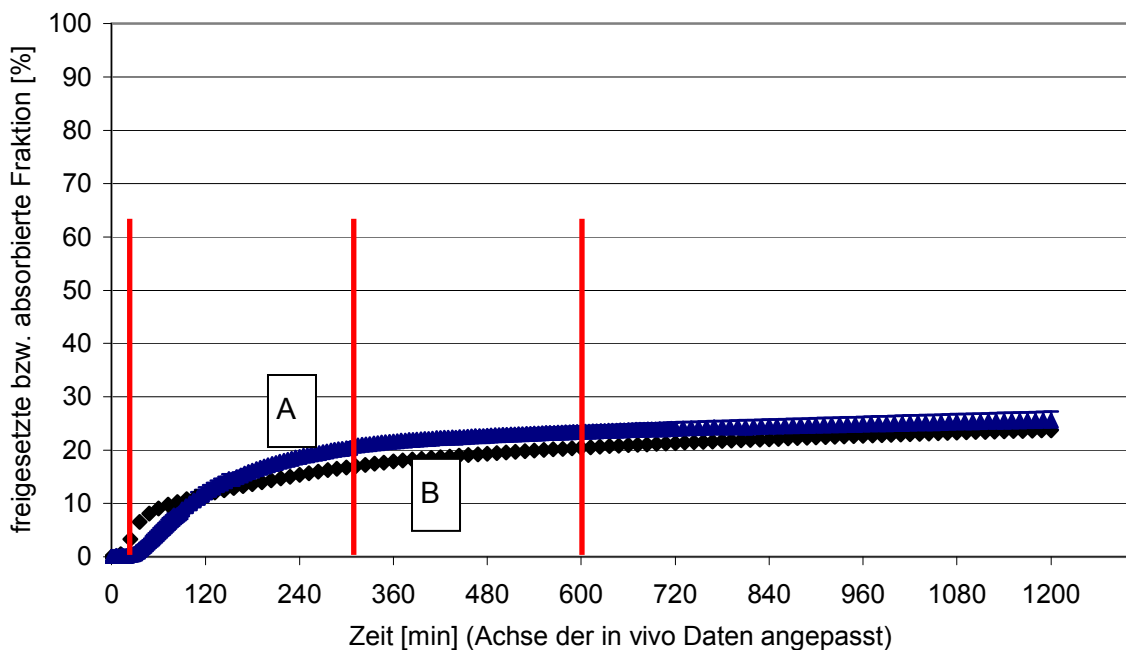


Abbildung 3-31: Arzneiform C: Arzneiform B: Freisetzung mit der entwickelten Methode. A: in vitro Freisetzung; B: in vivo Absorptionskurve; senkrechte Linien: Zeitpunkte der Änderungen von Pumpgeschwindigkeit und pH-Wert [n=3 ± 95 % KI]

Die Daten aller drei Arzneiformen beweisen, dass sich die entwickelte Methode sehr gut eignet, um drei unterschiedliche und teilweise stark pH-abhängige Formulierungsansätze reproduzierbar und nahe an der in vivo Situation freizusetzen.

3 Ergebnisse

In Tabelle 3-12 ist die komplette entwickelte und für alle drei Arzneiformen gültige Methode zusammengefasst:

Zeit [min]	20	130	150	300	Rest
Zeit [min] gesamt	0 - 20	20 - 150	150 - 300	300 - 600	600 - 1200
pH	3	5,55	5,55	6,3	6,8
Geschwindigkeit der pH-Einstellung		gesamte Menge 4 N NaOH wird auf einmal zugesezt	langsam	langsam	langsam
Pumprate	10	25	25	10	10

Tabelle 3-12: Methode für SPE-Freisetzen

3.3.6 Überprüfung der IVIVC

Um Aussagen über die IVIVC der entwickelten SPE-Apparatur und der gefundenen Freisetzungsmethode treffen zu können, werden verschiedene Vergleiche zwischen den in vivo Daten und den gewonnenen Freisetzungsergebnissen durchgeführt (Tabelle 3-13). Da die Kurven augenscheinlich nahezu deckungsgleich sind, wird bei diesen Tests von Anfang an eine Level A-Korrelation angestrebt.

Arzneiform	Endwerte		F_a/F_d	AUC			$f_{2,10}$
	F_a [%]	$F_d \pm 95\% \text{ KI}$ [%]		in vivo [%·min]	in vitro [%·min]	vivo/vitro	
A	62,0	63,1 ± 0,8	0,983	56922	59132	0,96	72,38
B	63,7	63,9 ± 6,9	0,997	62723	62726	1,00	71,24
C	23,7	25,5 ± 1,7	0,929	22567	25154	0,90	76,21

Tabelle 3-13: Vergleichsparameter für die IVIVC

3 Ergebnisse

Es ergeben sich für alle verglichenen Parameter bzw. deren Quotienten, die als Maß für den Abstand der beiden Werte gebildet werden, sehr hohe Relationen. Hierdurch kann man es als bewiesen betrachten, dass sowohl die entwickelte Apparatur als auch die Methode ein hohes Maß an Biorelevanz aufweisen und somit zu einer hochwertigen IVIVC führen.

Obwohl laut Tabelle 3-13 die AUCs für Arzneiform C den größten Unterschied aufweisen, ergibt der f_2 -Test den höchsten Wert. Der Grund dafür ist das niedrige Freigabe- bzw. Absorptionsniveau. Während die AUC einen relativen Vergleich dadurch anstellt, dass die gesamten Werte auf eine Zahl kondensiert werden, werden beim f_2 -Test die Werte zu jedem Zeitpunkt direkt miteinander verglichen und erst dann zusammengefasst.

Anhand der erstellten Levy-Plots wird erneut deutlich, dass sich die in-vitro Freisetzen, was Ausmaß und Geschwindigkeit betrifft, nahe an der in vivo Situation der drei Formulierungen bewegen und diese so detailgetreu abbilden können. Sowohl Steigungen als auch Korrelationskoeffizienten erreichen Werte nahe 1 und liegen damit nahe des Optimums. Die exakten Werte der Steigungen und Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 3-14 notiert.

Parameter	Arzneiform A	Arzneiform B	Arzneiform C
Steigung des Levy-Plots	0,974	0,986	0,888
Korrelationskoeffizient	0,965	0,940	0,926

Tabelle 3-14: Steigungen und R^2 -Werte der Levy-Plots

Bei Betrachtung der Parameter wird deutlich, dass alle drei Arzneiformen sehr gut durch die SPE-Apparatur abgebildet werden können. Um zu einem mathematischen Modell zu gelangen wird ein Levy-Plot erstellt, bei dem die Regression durch den Vergleich aller Arzneiformen gebildet wird (Abbildung 3-32). Die Steigung dieser Regressionsgerade dient als Scaling-Faktor gemäß Gleichung 2-4.

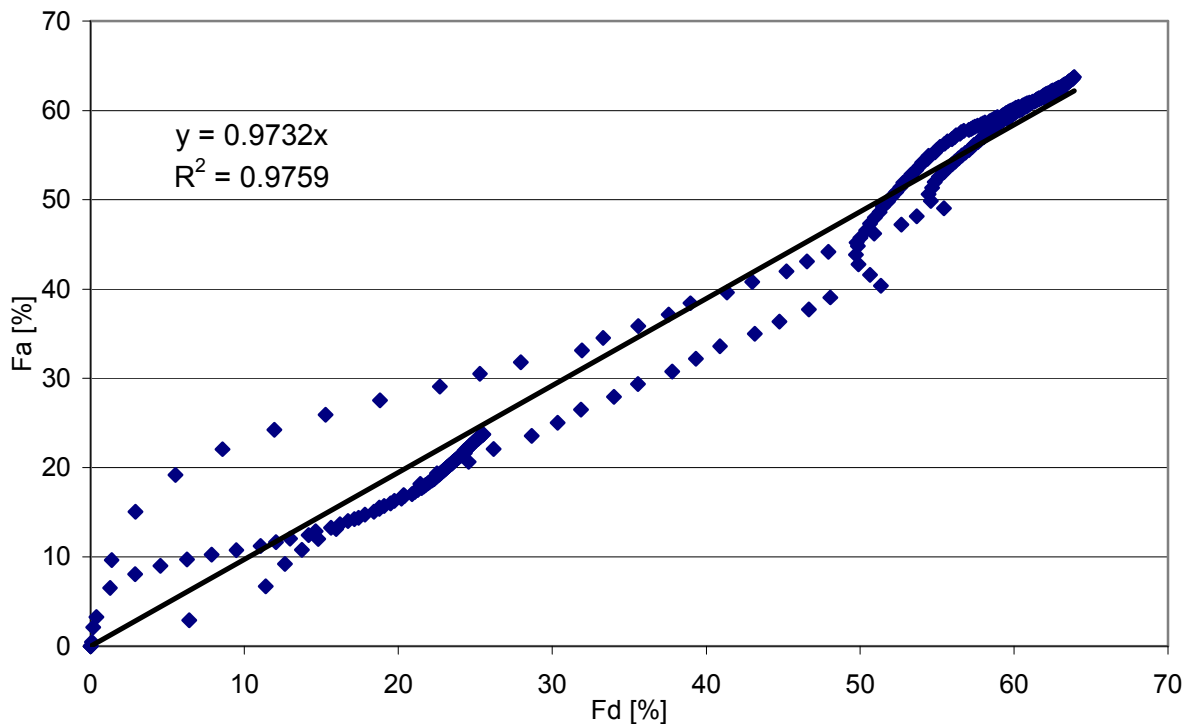


Abbildung 3-32: Levy-Plot über alle Arzneiformen. Schwarze Linie: Regressionsgerade

Da die Steigung mit 0,9732 einen Wert sehr nahe an 1 annimmt, wird der Faktor für die Skalierung der absorbierten Menge auf 1 gesetzt, wodurch das mathematische Modell deutlich vereinfacht wird. Durch den Wert der Steigung ist bewiesen, dass die Kurven deckungsgleich sind und dass kein weiterer Faktor in die Korrelation einzufügen ist. Dementsprechend ergibt sich folgende Gleichung im Rahmen der Level A-IVIVC (vgl. Gleichung 2-4):

$$F_a = 1 \cdot F_d (4,8 \cdot T_{\text{vivo}})$$

Der erreichte Korrelationslevel ist der höchste zu erzielende und könnte auch bei der Zulassungsbehörde registriert werden. Das bedeutet, dass die in vitro Methode in der Lage ist, die in vivo Absorption von BIXX aus seinen Formulierungen 1:1 abzubilden.

Durch die bewiesene IVIVC der Freisetzungsmethode könnte bei Änderungen an Formulierung oder Herstellung auf Bioäquivalenz-Studien verzichtet werden. Der Beweis, dass die Änderungen keinen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit des Stoffes haben, könnte durch reine in vitro Testung erbracht werden. Damit wären solche Änderungen mit deutlich geringerem regulatorischen Aufwand und dementsprechend reduzierten Kosten verbunden.

3.3.7 Bewertung der SPE-Ergebnisse

Das Set-Up des SPE-Modells stellt eine gute Mischung aus einfachem Aufbau und Komplexität dar. Im Vergleich mit dem am weitesten an den Körper angepassten TIM (Kapitel 1.5), kann durch die vergleichsweise simple SPE-Anlage ein ausreichend genaues Bild der in vivo Situation gezeichnet werden (Venema et al. 2000). Anderen modernen Freisetzungssystemen, wie dem Transfermodell (Kostewicz et al. 2003) oder den zweiphasigen Anlagen (Grundy et al. 1997a; Pillay et al. 1999) ist das SPE-Modell, nach jetzigem Stand der Technik, ebenfalls überlegen. So bietet es gegenüber dem Transfermodell deutlich mehr Freiheitsgrade, um die Freisetzungssituation an die Verhältnisse im Intestinum anzupassen. Trotzdem kann die Präzipitation des Wirkstoffs im Freisetzungskompartiment ausreichend genau abgebildet werden. Der Vorteil der SPE-Apparatur gegenüber dem zweiphasigen Ansatz liegt darin, dass durch die Pumpe der Wirkstoff sowohl im ungeladenen, wie in den Octanol-Modellen, als auch im geladenen Zustand aus dem Freisetzungsmedium entfernt wird. Dadurch ist nicht die Diffusion aus der wässrigen Phase in die organische Phase, also die Entfernung des Arzneistoffs aus dem Freisetzungskompartiment, der geschwindigkeitslimitierende Schritt, sondern die tatsächliche Performance der Formulierung.

Die Anpassungen der Methode über die Entwicklung hinweg führen dazu, dass das gebaute Modell die komplizierten Zusammenhänge im Verdauungstrakt des menschlichen Körpers gut abbildet. Die letztendlich gefundene Methode zeigt dementsprechend ein hohes Maß an Biorelevanz, welches durch die Annäherung vieler Versuchsparameter an die Verhältnisse im menschlichen gastrointestinalen Trakt definiert wird. Dabei werden durch die unterschiedlichen Pumpgeschwindigkeiten die unterschiedlichen Absorptionsgeschwindigkeiten in den jeweiligen Abschnitten des gastrointestinalen Trakts simuliert. Da die Umstellung der Pumpgeschwindigkeiten jeweils nach einer, der Transitzeit des jeweiligen simulierten Darmabschnitts nachempfundenen, Versuchsdauer erfolgt, wird auch die Passagedauer durch diese Abschnitte exakt abgebildet. In den jeweiligen Zeiträumen werden außerdem die, dem gerade simulierten Darmabschnitt, zuzuordnenden pH-Werte eingestellt. Durch die Beachtung und Einstellung der genannten Parameter ist es möglich, die in vivo Kurven nachzuvollziehen und somit zu einem Level A-Ranking für die getesteten Arzneiformen von BIXX zu gelangen.

Trotzdem ist die gesamte Apparatur durch das hohe Maß an Automation leicht handhabbar und bei Bedarf schnell an weitere Benutzer zu übergeben. Neben der einfachen Bedienbarkeit spricht für den Einsatz der Apparatur im Routineeinsatz, dass außer dem Freisetzungspuffer keine weiteren Medien herzustellen sind und die Anlage während des Versuchs so gut wie keine Betreuung benötigt. Durch den modularen Aufbau, bei dem die pH-Kontrolle als schnell einzusetzender Baustein zum Modell dazugefügt werden kann, kann die Anlage in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung verwendet werden. Die Anlage kann einerseits bei

3 Ergebnisse

der Auswahl der Prototypen verwendet werden, die in Phase-I-Studien eingesetzt werden sollen. Andererseits könnte man auch Effekte, die in klinischen Studien aufgetreten sind, in vitro abbilden, um sie so erklären zu können.

Leider ergibt sich auf Grund des Entfernungsmechanismus über die chromatographische Säule keine Möglichkeit FaSSIF bzw. FeSSIF in der Anlage einzusetzen. Sowohl Lecithin als auch Taurocholat werden auf der Säule fixiert und stehen dem Freisetzungskompartiment damit nicht mehr zur Verfügung. Auch eine direkte Kombination der Anlage mit Caco-2-Zellen ist wegen des Trappings von Substanzen auf der Säule nicht möglich. Die Substanzen, die sich im Transportpuffer bei Caco-2-Experimenten befinden müssen, um die Lebensfähigkeit der Zellen zu gewährleisten, würden auf der Säule zurück gehalten werden.

Eine Kombination beider in der Arbeit entwickelten Modelle könnte die Qualität biorelevanter Freisetzungs- bzw. Permeationsdaten jedoch nochmals deutlich verbessern. Während die Caco-2-Zellen den qualitativen Teil der Absorption des Arzneistoffs und die Wirkung der Hilfsstoffe auf die Permeation wieder geben, wird der Wirkstoff durch die Pumpe und die Säule entsprechend den Absorptionsverhältnissen im menschlichen intestinalen Trakt quantitativ entfernt.

Der Nachteil der langsamen Datengewinnung kann durch eine Erweiterung um zusätzliche Säulen und Pumpen umgangen werden. Diese wären parallel mit dem bisher verwendeten Aufbau zu betreiben. Dadurch könnten Prototypen in mehreren Vesseln gleichzeitig freigesetzt werden. Somit wird die Zeit, die nötig ist, um zu statistisch auswertbaren Dreifachbestimmungen zu gelangen, deutlich reduziert. Durch den einfachen Aufbau und die einfache Bedienung des gesamten Modells, sind im Falle einer Erweiterung um zusätzliche Kanäle keine Handlingprobleme zu erwarten.

Da die Methode die Verhältnisse im gastrointestinalen Trakt gut abbildet, ist es vorstellbar, sie ohne weitere Änderungen auf andere BCS 2-Substanzen sowie auf BCS 1-Stoffe übertragen zu können. Bei Wirkstoffen, die BCS 2 bzw. 4 klassifiziert sind und bei denen die schlechte Bioverfügbarkeit nicht auf enzymatischer Zersetzung im Darm beruht, könnte durch Herabsetzen der Pumpgeschwindigkeiten eine Anpassung der simulierten Absorption erreicht werden. Entsprechend den bisher erhaltenen Ergebnissen scheint das Modell eine gute Alternative zu bisher eingesetzten Standard-Methoden bei der Bestimmung der Freisetzungsprofile von modified release Formulierungen darzustellen. Allerdings wären zur Bestätigung dieser Vermutungen Versuche mit Stoffen aus anderen BCS-Klassen nötig.

4 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die gleichzeitige Abbildung von Freisetzung und Absorption von Wirkstoffen im bzw. aus dem menschlichen gastrointestinalen Trakt. Zu diesem Zweck werden zwei Modelle entwickelt und getestet. Anhand eines dynamischen Caco-2-Modells soll, unter Verwendung der intestinalen Caco-2-Zelllinie, der qualitative Einfluss von Hilfsstoffen bzw. festen oralen Arzneiformen auf die Permeation von Wirkstoffen untersucht und dargestellt werden. Mit dem zweiten Modell, einer Freisetzungsapparatur, bei der der freigesetzte Wirkstoff durch Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) auf einer semipräparativen Chromatographiesäule gebunden werden soll, sollen quantitative Zusammenhänge zwischen den beiden biopharmazeutischen Prozessen untersucht werden.

Einführung in die Problemstellung

Ausgangspunkt für die Anstrengungen diese beiden biopharmazeutischen Prozesse simultan und in Abhängigkeit von einander in einer Apparatur zu untersuchen, ist der Umstand, dass die Formulierungen vieler neuer Wirkstoffe direkten Einfluss auf die Löslichkeit oder die Absorption von Wirkstoffen nach ihrer Freisetzung haben. Die aufwändigen Formulierungsansätze sind die Konsequenz aus den immer komplizierter werdenden physiko-chemischen und damit biopharmazeutischen Eigenschaften neu entdeckter Arzneistoffe. Da die bisherigen Charakterisierungsmöglichkeiten, die standardisiert und durch die Arzneibücher legitimiert sind, nicht an die neuen Herausforderungen angepasst werden, besteht Bedarf nach Neuentwicklungen in diesem Bereich. Um die Vorhersagekraft neuer Freisetzungsmodelle zu verbessern, sollten diese ein hohes Maß an Biorelevanz aufweisen. Biorelevanz bedeutet, dass sich die Freisetzungsparameter an die Verhältnisse im menschlichen gastrointestinalen Trakt annähern. Bisher sind zwar verschiedene neue Freisetzungsapparaturen veröffentlicht worden, allerdings gelingt es diesen entweder nicht, den gesamten Bereich von Freisetzung und Absorption abzubilden oder sie sind zu aufwändig in ihrem Betrieb, um zur Routinetestung herangezogen werden zu können. Das Maß für die Annäherung von in vivo und in vitro Situation ist die in vivo/in vitro Korrelation (IVIVC). Die Erstellung der IVIVC für die in dieser Arbeit verwendeten Prototypen ist dementsprechend ebenfalls Bestandteil der durchzuführenden Arbeiten.

Dynamische Caco-2-Anlage

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Aufbau und der Entwicklung der dynamischen Caco-2-Apparatur. Diese besteht aus zwei Kreisläufen, dem darmseitigen apikalen und dem blutseitigem basolateralen. Die beiden Seiten des Modells werden durch den Caco-2-Monolayer getrennt bzw. verbunden. Da die meisten Stoffe rein passiv durch diese Zellschicht diffundieren, hängt die basolateral ankommende Stoffmenge direkt von der Konzentration des Stoffes im Donorkompartiment ab. Basierend auf diesem Umstand kann man die

qualitativen Zusammenhänge zwischen freigesetzter Fraktion eines Wirkstoffs und absorbierter Fraktion betrachten. Eine quantitative Untersuchung ist jedoch wegen der geringen zur Verfügung stehenden Permeationsoberfläche nicht möglich. In dieser Arbeit unternommene Versuche, die Größe des Monolayers durch Kultivierung der Caco-2-Zellen auf größeren Filtern zu erhöhen, gelingen teilweise. Die Zellen lassen sich zwar auf den deutlich größeren Flächen kultivieren und für Versuche verwenden, allerdings gelingt der Einsatz dieses Filtertyps in der entwickelten dynamischen Apparatur nicht, da es zu einem Volumenstrom durch oder um den Filter(-einsatz) kommt, durch den der untersuchte Stoff unkontrolliert in das basolaterale Kompartiment gelangt.

In den ersten Versuchen mit der Apparatur wird die Eignung der Anlage getestet. Dazu werden unterschiedliche Konzentrationen eines Modellarzneistoffs (Theophyllin) untersucht. Die Ziele dieser Versuche sind einerseits hohe Reproduzierbarkeit und andererseits Vergleichbarkeit der Daten mit einer vorangegangenen Diplomarbeit. Weiterhin soll, ebenfalls basierend auf der genannten Diplomarbeit, untersucht werden, ob Theophyllin auch bei hoher Konzentration noch passiver Diffusion unterliegt. Die Ergebnisse zeigen klar, dass dies der Fall ist und bei der Permeation von Theophyllin keine aktiven Transporter beteiligt sind.

Erstmals wird mit einer solchen Apparatur auch ein groß angelegtes Hilfsstoffscreening durchgeführt. Dabei werden nicht nur Substanzen untersucht, die für die Beeinflussung der Permeation bekannt sind, sondern auch Hilfsstoffe, deren Einfluss bisher noch nicht untersucht wurde. Die aus diesem Screening erhaltenen Daten bestätigen einige der bereits bekannten Ergebnisse, allerdings werden nicht alle Literaturdaten bestätigt. Grund für diesen Umstand ist, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen zum Teil deutlich unter den bisher verwendeten liegen. Allerdings sind die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen deutlich biorelevanter. Sie basieren auf den Einsatzmengen von Stoffen in Tabletten und der normalerweise mit der Tablette eingenommenen Flüssigkeitsmenge. Weiterhin wird deutlich, dass es eine scheinbare Obergrenze für die Permeation des Modellarzneistoffs (Apafant) gibt und dass die Kombination bestimmter Hilfsstoffe, die die Permeation normalerweise erhöhen können, zu einer Reduzierung ihrer Einzeleffekte führt. Dies ist wahrscheinlich auf die Bildung von Mischmizellen zurückzuführen, in die der Wirkstoff inkorporiert wird. Durch die Erniedrigung der zur Permeation zur Verfügung stehenden Arzneistoffmenge, sinkt die absorbierte Menge.

Die Ergebnisse der Versuche mit Freisetzung des Wirkstoffs aus seinen Arzneiformen zeigen, dass der Puffer, der für Versuche mit Caco-2-Zellen benötigt wird, zu Limitationen führen kann. Die aufwändigen Formulierungen des Modellarzneistoffs (BIXX) interagieren entweder mit dem Puffer oder können ihre Performance wegen der hohen Pufferkapazität nicht zeigen. Die Eignung solcher Modelle für Wirkstoffe mit kritischen physiko-chemischen

Eigenschaften wurde bereits durch Aussagen in der Literatur in Frage gestellt und durch die vorliegende Arbeit bestätigt.

SPE-Apparatur

Dieses Modell ist aus einer Standard-Paddleapparatur, einer präparativen HPLC-Pumpe und der semipräparativen Chromatographiesäule aufgebaut. Zur Füllung der Säule wird ein Kieselgelderivat verwendet, das zum Einsatz rein wässriger Puffersystem geeignet ist.

Bisher ist in der Literatur noch kein vergleichbares Modell beschrieben. Dementsprechend müssen zu Beginn die optimalen hardwareseitigen Parameter wie Vesselgröße und Umdrehungsgeschwindigkeit des Paddles bestimmt werden. Weiterhin muss überprüft werden, ob sich durch unterschiedliche Pumpraten, die unterschiedlichen Eliminationskonstanten entsprechen, ein Einfluss auf die Freisetzungsgeschwindigkeit ergibt. Diese Versuche sind als proof of concept angelegt. Bei der Auswertung der Versuche zeigt sich, dass durch schnellere Pumpraten größere Endfreigaben mit deutlichen steilerem Anstieg generieren lassen, als bei langsamer Entfernung des Wirkstoffs. Dadurch gilt das Funktionsprinzip als erwiesen.

Um die in vivo Absorptionskurven von BIXX durch in vitro Experimente besser abbilden zu können, wird versucht über Änderungen der Pumpgeschwindigkeit die Freigaben entsprechend zu steuern. Allerdings sind die Eigenschaften der unterschiedlichen Prototypen bezüglich ihrer Empfindlichkeit auf den pH-Wert des Freisetzungsmediums zu komplex, um eine exakte Abbildung der in vivo Situation bei konstantem pH-Wert zu ermöglichen. Um diesem Umstand entsprechend Sorge tragen zu können, wird als neues Modul ein automatischer Titrator in die Anlage integriert. Durch diesen ist es möglich, zusätzlich zu den Änderungen der Pumprate auch den pH-Wert während der Versuche zu kontrollieren und zu bestimmten Zeitpunkten anzupassen.

Durch Kombination von Veränderungen von sowohl Pumprate als auch Versuchs-pH gelingt es, eine Freisetzungsmethode zu erarbeiten, die in der Lage ist, die in vivo Kurven sehr genau abzubilden. Die entwickelte Methode bildet die Bedingungen des menschlichen Verdauungstrakts bezüglich pH-Verlauf und Absorptionsgeschwindigkeit sehr exakt nach. Das heißt, dass während des simulierten Transits durch das Intestinum die entsprechenden pH-Werte der Darmanschnitte eingehalten werden. Zusätzlich ist die Pumprate, die als Äquivalent zur Absorptionsgeschwindigkeit zu betrachten ist, im Zeitraum, in dem die Dünndarmpassage simuliert wird, höher als bei der Abbildung von Magen bzw. Dickdarm. Die jeweiligen Zeiträume zwischen Änderungen von Pumpgeschwindigkeit und pH-Wert entsprechen der Aufenthaltsdauer im jeweiligen Darmabschnitt. Durch eine erhöhte Rührgeschwindigkeit gelingt es, den Wirkstoff relativ schnell aus den Formulierungen freizusetzen. Dadurch können 96 h Humandaten mit 20 h in vitro Daten verglichen und abgebildet werden.

IVIVC

Für die Erstellung der IVIVC müssen in vitro und in vivo Daten in vergleichbaren Formaten vorliegen. Dazu werden die erhaltenen Plasmaspiegelkurven durch das Programm WinNonline (Pharsight) modelliert. Im ersten Schritt wird aus verfügbaren Daten der i.v.-Applikation von BIXX die Gewichtsfunktion errechnet. Diese gibt an, wie schnell der Wirkstoff aus dem Körper entfernt wird. Unter Verwendung der Gewichtsfunktion kann die Input-Funktion der jeweiligen Formulierungen durch numerische Dekonvolution erhalten werden. Die Input-Funktion bildet den absorbierten Anteil des Wirkstoffs über die Zeit ab und ermöglicht so den direkten Vergleich von in vivo mit in vitro Daten. Eine Möglichkeit des Vergleichs ist der Levy-Plot, bei dem die absorbierte Fraktion (in vivo) über die freigesetzte Fraktion (in vitro) aufgetragen wird. Je näher sich die Steigung einem Wert von 1 nähert und je höher der entsprechende Korrelationskoeffizient ist, desto besser wird durch in vitro Testung die in vivo Absorptionskurve beschrieben.

Der Levy-Plot der in dieser Arbeit untersuchten Prototypen ergibt eine Steigung von 0,97 bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,95. Dies bedeutet, dass die durch Einsatz der SPE-Apparatur erhaltenen Kurven nahezu deckungsgleich mit den in vivo Kurven dieser Formulierungen sind. Dies entspricht einem IVIVC-Level A und damit dem höchsten Korrelationsmaß, das im Rahmen einer IVIVC erreicht werden kann.

Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse beider Apparaturen und der durchgeführten IVIVC zeigen, dass die Entwicklungen in der Lage sind, den ihnen zugedachten Verwendungszweck auszufüllen. So sind die Daten der Anlagen valide und reproduzierbar. Außerdem wird für beide Modelle ein hohes Maß an Automation erreicht, wodurch die Bedienbarkeit erleichtert und Fehlerquellen reduziert werden.

Jedoch ist es nicht gelungen, durch Verwendung der großen Filter eine bessere Korrelation zwischen in vitro und vivo Versuchen zu erlangen. Trotzdem kann die Caco-2-Anlage für verschiedene Anwendungen eingesetzt werden. Die Durchführung eines Hilfsstoffscreenings und die Untersuchungen ganzer Arzneiformen sind jederzeit schnell und unkompliziert möglich. Allerdings dürfen die Eigenschaften der untersuchten Wirkstoffe nicht zu extrem werden. Insgesamt wird durch die Etablierung des Modells eine gute Möglichkeit geschaffen, den qualitativen Einfluss von Hilfsstoffen und Formulierungen auf die Permeation abzubilden. Die Frage der Skalierbarkeit der Ergebnisse könnte jedoch nur durch in vivo Daten geklärt werden.

Die SPE-Apparatur zeigt, dass durch geschickte apparative Parameter und sinnvolle Änderungen an Versuchs-pH und Pumpgeschwindigkeit die in vivo Verhältnisse so abgebildet werden, dass der erzielte Level A auch für andere Wirkstoffe und ihre Formulierungen möglich ist. Durch den simplen apparativen Aufbau und das einfache Handling, wird eine Möglichkeit geschaffen, schon zu einem frühen Zeitpunkt der Formulierungsentwicklung erste detaillierte Hinweise auf die zu erwartende in vivo Performance der Prototypen zu bekommen.

5 Anhang

5.1 Verwendete Materialien und Geräte

5.1.1 Eingesetzte Hard- und Software

Sämtliche eingesetzte Computer sind mit Intel Prozessoren ausgerüstet. Betriebssystem ist auf allen Rechnern Windows XP Professional.

Anwendung	Software
Schreibarbeiten	Microsoft Word 2003
Tabellenkalkulation und Diagramme	Microsoft Excel 2003
Graphiken	Microsoft PowerPoint 2003
Statistische Berechnungen	GraphPad Prism 5.02
Dekonvolution	Pharsight WinNonline 5.2
Caco-2-Modell	Modell und Hersteller
μSIA	μSIA; FIALab
Fraktionensammler	AIM3200; FIALab
Dissolutionsbad	AT7; Sotax
Laborrührer	Hei-Tec; Heidolph
Pumpen	Minipuls2; Gilson
SIA-Software	FIALab 5.0; FIALab
SPE-Modell	Modell und Hersteller
Säule	eco ^{plus} (Innendurchmesser 50 mm, Länge 50 cm); Kronlab
Säulenmaterial	ODS-AQ (Partikelgröße 50 μm); YMC Europe
Dissolutionsbad	AT7; Sotax

5 Anhang

Titratoren	Titrando 842; Mettler Toledo
Pumpe	KD50/400 SS; Kronlab
UV-DAD-Gerät	DAD 8542; Agilent
DAD-Software	Agilent Chemstation
Titratoren-Steuerung	Mettler Tiemo 1.2

Tabelle 5-1: Verwendete Software und Geräte

5.1.2 Materialien der Zellkultur

Medien und Chemikalien	Hersteller und Bestell- bzw. Chargennummer
Collagen	Seromed; Best.-Nr. L7213
DMEM (4,5 g Glucose/l)	Invitrogen; Best.-Nr. 61965-026
EDTA (1 %) in PBS ⁻	Seromed; Best.-Nr. L2113
FKS	Boehringer Mannheim; Best.-Nr. 210471; Charge 14865902
NEAA, 100x	Seromed; Best.-Nr. K0293
PBS	Invitrogen; Best.-Nr. 10010031
Penicillin/Streptomycin	Seromed; Best.-Nr. A2213
Trypsin (1:250)	Seromed; Best.-Nr. L2133

Tabelle 5-2: Medien der Zellkultur

Produkt	Hersteller und Bestellnummer
75 cm ² Kulturflasche	Cellstar, belüftete Kappe, 75cm ² , 250ml, DNase & RNase frei; Greiner; Best.-Nr. 658175
50 ml Falcon-Tube	50 mL PP, steril; Greiner; Best.-Nr. 227.261
Snapwell PC-Filter	Costar 12 mm Snapwell; Corning; Best.-Nr. 3407
Snapwell PE-Filter	Costar 12 mm Snapwell; Corning; Best.-Nr. 3801
Transwell PC-Filter	Transwell 75 mm; Corning; Best.-Nr. 3419

Tabelle 5-3: Materialien der Zellkultur

5.2 Programm zum automatischen Probenzug durch die SIA-Anlage

'Trägerflüssigkeit (Wasser) ansaugen

Syringe Pump Valve In

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 200

Syringe Pump Aspirate (microliter) 775

Syringe Pump Delay Until Done

Delay (sec) 1

Syringe Pump Valve Out

Multiposition Valve Air

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 150

Syringe Pump Aspirate (microliter) 200

Syringe Pump Delay Until Done

'Probenzug

Multiposition Valve SampleA

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 100

Syringe Pump Aspirate (microliter) 1000

Syringe Pump Delay Until Done

Delay (sec) 5

'Überführen der Probe zum Multisampler

Multiposition Valve Multisampler

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 150

'in Abhängigkeit des Schlauchvolumens

Syringe Pump Dispense (microliter) 1775

Syringe Pump Delay Until Done

autosampler Up

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 200

5 Anhang

Syringe Pump Aspirate (microliter) 775

Syringe Pump Delay Until Done

Multiposition Valve Waste

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 200

Syringe Pump Empty

Syringe Pump Delay Until Done

Delay (sec) 1

'Ersetzen des entnommenen Volumens

Syringe Pump Valve In

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 200

Syringe Pump Aspirate (microliter) 100

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Valve Out

Multiposition Valve Air

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 150

Syringe Pump Aspirate (microliter) 450

Syringe Pump Delay Until Done

Multiposition Valve BufferA

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 150

Syringe Pump Dispense (microliter) 300

Syringe Pump Delay Until Done

Multiposition Valve BufferA

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 150

Syringe Pump Aspirate (microliter) 1000

Syringe Pump Delay Until Done

Delay (sec) 5

Multiposition Valve SampleA

5 Anhang

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 100

Syringe Pump Dispense (microliter) 1100

Syringe Pump Delay Until Done

Delay (sec) 1

Multiposition Valve Waste

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 100

Syringe Pump Empty

Syringe Pump Delay Until Done

'Auf nächsten Befehl warten

5.3 Analytische Methoden

5.3.1.1 Theophyllin (HPLC)

Anlage	Agilent 1100 Series
Säule	Zorbax Extend C-18 4,6 x 75 mm (Teilenummer:B07109)
Fließmittel	Wasser : Methanol (15 : 85)
Fließrate	1 ml/min
Detektion	272 nm

Tabelle 5-4: HPLC-Methode Theophyllin

Residuenplot:

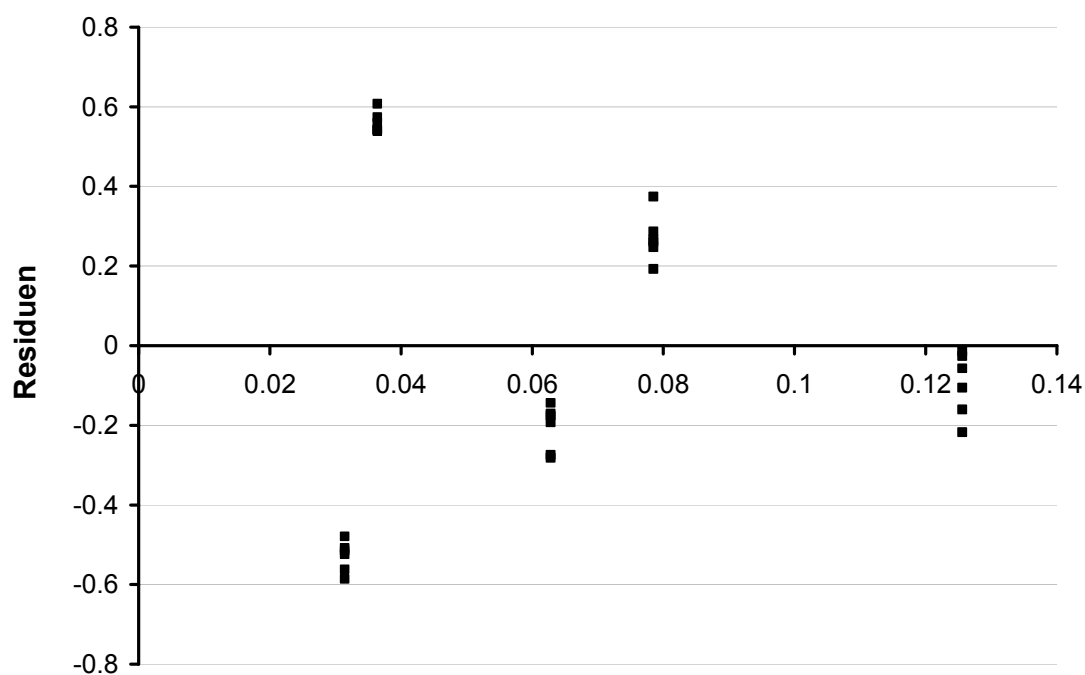


Abbildung 5-1:Residuenplot Theophyllin

Steigung	297,559
Ordinatenabschnitt	0,754
Korrelationskoeffizient r	0,9993
Bestimmtheitsmaß r^2	0,9990

Tabelle 5-5: Kalibrierung Theophyllin

5.3.1.2 Apafant (HPLC)

Anlage	Agilent 1100 Series
Säule	Zorbax Extend C-18 4,6 x 75 mm (Teilenummer:B07109)
Fließmittel	Wasser : Acetonitril (35 : 65)
Fließrate	1,5 ml/min
Detektion	242 nm

Tabelle 5-6: HPLC-Methode Apafant

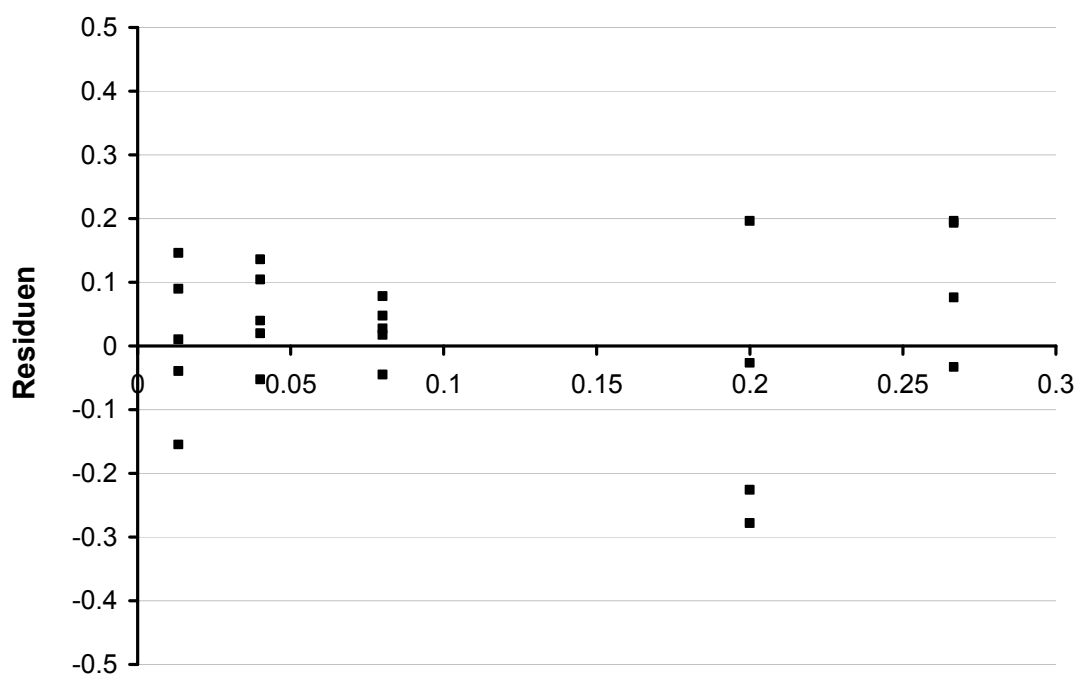
Residuenplot:

Abbildung 5-2: Residuenplot der Apafant-HPLC-Kalibrierung

Steigung	147,210
Ordinatenabschnitt	1,521
Korrelationskoeffizient r	0,99990
Bestimmtheitsmaß r^2	0,99990

Tabelle 5-7: Kalibrierung Apafant

5.3.1.3 BIXX (HPLC)

Anlage	Agilent 1100 Series
Säule	Zorbax Extend C-18 4,6 x 75 mm (Teilenummer: B07109)
Fließmittel	0,2 % Citratpuffer pH 4 : Acetonitril (60 : 40)
Fließrate	1 ml/min
Detektion	250 nm

Tabelle 5-8: HPLC-Methode BIXX

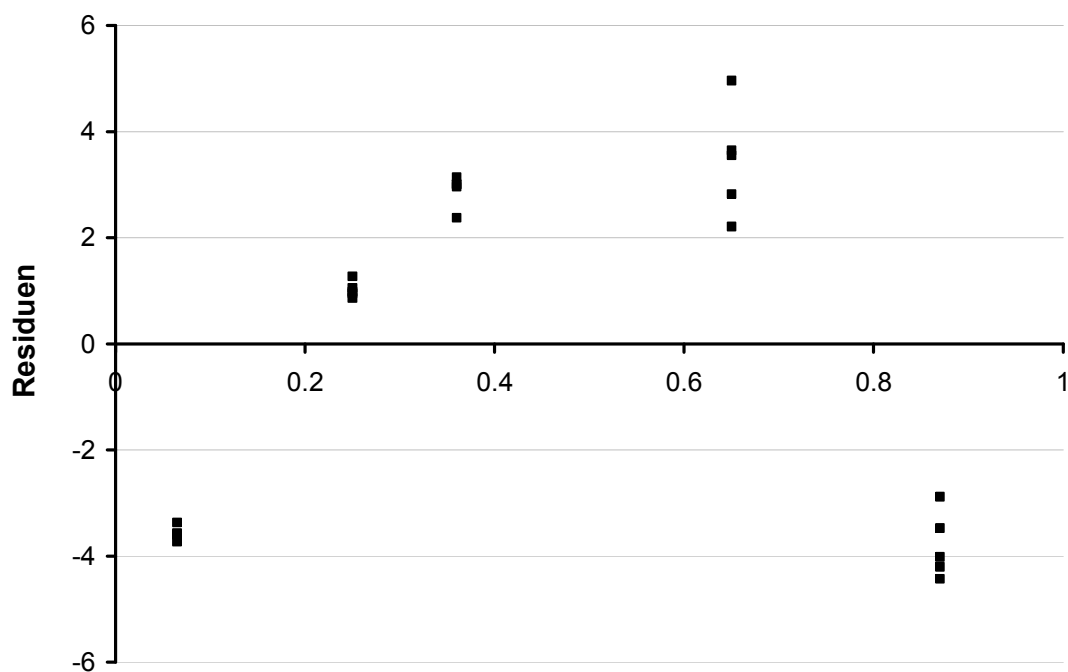
Residuenplot:

Abbildung 5-3: Residuenplot der BIXX-Kalibrierung (HPLC)

Steigung	367,007
Ordinatenabschnitt	0,399
Korrelationskoeffizient r	0,9990
Bestimmtheitsmaß r^2	0,9991

Tabelle 5-9: Kalibrierung BIXX (HPLC)

5.3.1.4 BIXX (UV)

 Anlage Agilent DAD 8543

 Detektion 278 nm

Tabelle 5-10: UV-Vis-Methode BIXX

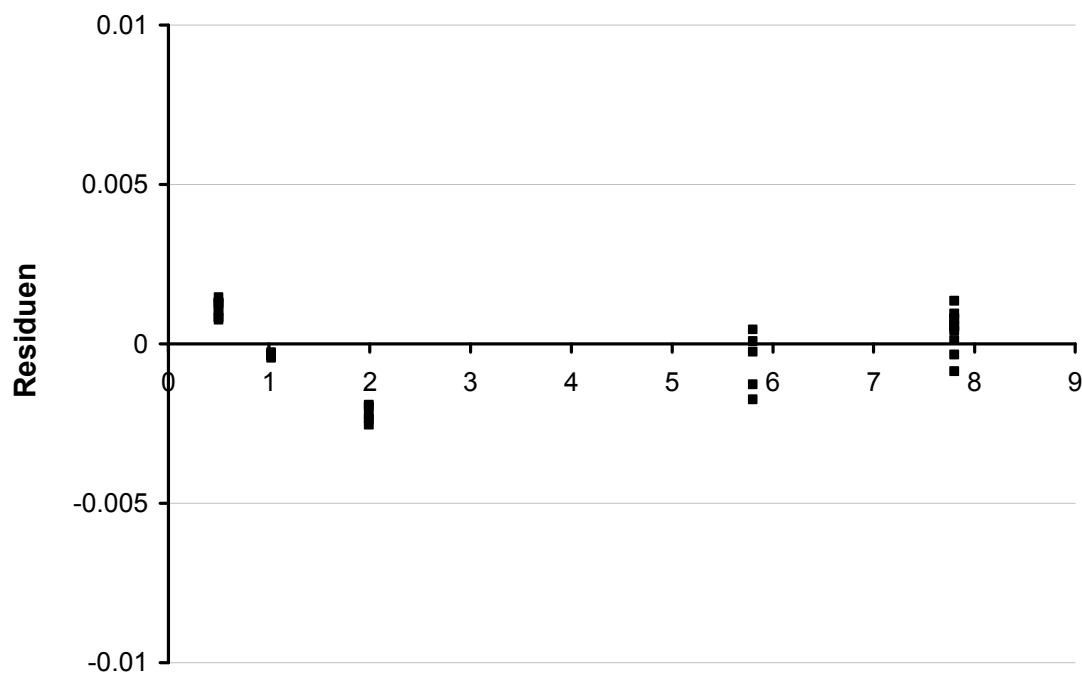
Residuenplot:

Abbildung 5-4: Residuenplot der BIXX-Kalibrierung (UV)

Steigung	0,020
Ordinatenabschnitt	-0,002
Korrelationskoeffizient r	0,9998
Bestimmtheitsmaß r^2	0,9996

Tabelle 5-11: Kalibrierung BIXX (UV)

5.4 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1-1: Gastrointestinaler Trakt (www.wikipedia.de)	3
Abbildung 1-2: Aufbau des Darmes (DeSesso et al. 2001)	4
Abbildung 1-3: Oberflächenvergrößerung im gastrointestinalen Trakt (Reppas et al. 1995)	5
Abbildung 1-4: Beschreibung des Körpers bei der numerischen Dekonvolution	17
Abbildung 1-5: Zusammenhang zwischen Input-, Gewichts- und Antwortfunktion	18
Abbildung 1-6: Konfluenten Caco-2-Monolayer	23
Abbildung 1-7: Mögliche F_a/F_d -Plots	27
Abbildung 1-8: Kombiniertes Modell von Ginski	29
Abbildung 1-9: Kombiniertes Modell von Miyazaki	30
Abbildung 1-10: Kombiniertes Modell von Kataoka	31
Abbildung 1-11: Das Modell von Motz et al. (2006)	32
Abbildung 1-12: Bisherige Freigaben von Arzneiform A. A: in vivo Absorption; B: Freisetzung bei pH 1; C Freisetzung bei pH 5,5 und Cremophor Zugabe [n=12]	35
Abbildung 1-13: Bisherige Freigaben von Arzneiform B. A: in vivo Absorption; B: Freisetzung bei pH 1; C: Freisetzung bei pH 5,5 und Cremophor Zugabe [n=12]	36
Abbildung 1-14: Bisherige Freigaben von Arzneiform C. A: in vivo Absorption; B: Freisetzung bei pH 1; C: Freisetzung bei pH 5,5 und Cremophor Zugabe [n=12]	36
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Filter-Kammer-Systems	43
Abbildung 2-2: Snapwell-System (1,13 cm ²) (Fa. Corning; Quelle: www.corning.com)	44
Abbildung 2-3: Transwell-System (44 cm ²) (Fa. Corning; Quelle: www.corning.de)	44
Abbildung 2-4: Fluorescein	47
Abbildung 3-1: Graphische Darstellung des Kurvenverlaufs bei Verwendung des 2-kompartimentellen Modells. Punkte: Gemessene Plasmakonzentrationen; Linie: modellierte Gewichtsfunktion	54
Abbildung 3-2: In vivo Absorption der untersuchten Prototypen nach Dekonvolution. A: Arzneiform A; B: Arzneiform B; C: Arzneiform C	55
Abbildung 3-3: Schematischer Aufbau der dynamischen Caco-2-Apparatur	57

Abbildung 3-4: Dynamische Caco-2-Apparatur. Im Kreis ist der Einbauort der Diffusionszelle gekennzeichnet	59
Abbildung 3-5: Schnitt durch die doppelseitige Diffusionszelle mit unten liegendem tangentialen Zulauf	60
Abbildung 3-6: μ SIA (FIA-Lab). Rechts das steuerbare 8-Kanal-Ventil, links die Kolbenpumpe zum Ansaugen und Dosieren der jeweiligen Flüssigkeiten	60
Abbildung 3-7: Fischgrätendiagramm zur Robustheit des Caco-2-Modells	61
Abbildung 3-8: Permeationskoeffizienten von Theophyllin bei verschiedenen Konzentrationen. Graue Balken: Ergebnisse der Diplomarbeit an PE-Filtern; schwarze Balken: Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit PC-Filtern [n=3 \pm 95 % KI]	64
Abbildung 3-9: Zusammenfassung der Ergebnisse des Hilfsstoffscreenings: Gestreifter Balken: Permeationskoeffizient von WEB2086; weiße Balken: Kein Einfluss auf Permeation; graue Balken: moderater Einfluss auf Permeation, schwarze Balken: großer Einfluss auf Permeation [n=3-5 \pm 95 % KI]	67
Abbildung 3-10: Konzentrationabhängigkeit und Kombinationseffekte: Gestreifter Balken: Permeationskoeffizient von WEB2086; weiße Balken: Kein Einfluss auf Permeation; graue Balken: moderater Einfluss auf Permeation, schwarze Balken: großer Einfluss auf Permeation [n=3-5 \pm 95 % KI]	68
Abbildung 3-11: Quotienten $P_{\text{eff/Hilfsstoff}}/P_{\text{eff/Apafant}}$: Schwarzer Balken: P-gp-Effekt aus der Literatur; graue Balken: Effekte des durchgeführten Hilfsstoffscreenings [n=3]	69
Abbildung 3-12: Vergleich zwischen 1,13 cm ² großen und 44 cm ² großen PC-Filtern. Schwarze Balken: Permeationskoeffizienten bei verschiedenen Theophyllinkonzentrationen an großen Filtern; graue Balken: Permeationskoeffizienten der gleichen Konzentrationen an kleinen Filtern [n=3 \pm 95 % KI]	72
Abbildung 3-13: Schnitt durch die zweiseitige Durchflusszelle für große Membranen	73
Abbildung 3-14: Freigesetzte Fraktion der verschiedenen Arzneiformen in HBSS. Karos: Matrixtablette A; Quadrate: Pellets B; Dreiecke: 1 % Pellets in 9 ml Puffer [n=3 \pm 95 % KI]	76
Abbildung 3-15: Permeierte Wirkstoff-Menge der dynamischen Experimente. Karos: Matrixtablette A; Quadrate: Pellets B; Dreiecke: 1 % Pellets in 9 ml Puffer [n=3 \pm 95 % KI]	78
Abbildung 3-16: Permeationskoeffizienten bei kombinierten Versuchen. Karos: Matrixtablette A; Quadrate: Pellets B; Dreiecke: 1 % Pellets in 9 ml Puffer [n=3 \pm 95 % KI]	79
Abbildung 3-17: Schematischer Aufbau der SPE-Apparatur	85

Abbildung 3-18: SPE-Apparatur	86
Abbildung 3-19: Verwendung des Gels mit wässrigen Puffern (www.ymc-europe.com)	87
Abbildung 3-20: Vergleich der Vesselgrößen und Rührgeschwindigkeiten bei einer Pumpgeschwindigkeit von 100 ml/min: A: 50 UpM / 250 ml Vessel; B: 100 UpM / 250 ml Vessel; C: 150 UpM / 900 ml Vessel [n=3 ± 95 % KI]	89
Abbildung 3-21: Arzneiform E: Vergleich unterschiedlicher Pumpgeschwindigkeiten und der USP 2-Apparatur. A: 100 ml/min; B: 30 ml/min; D: 10 ml/min; C: Paddle-Apparatur [n=3 ± 95 % KI]	90
Abbildung 3-22: Arzneiform A: Vergleich unterschiedlicher Pumpgeschwindigkeiten und der USP 2-Apparatur. A: 100 ml/min; C: 10 ml/min; D: 4 ml/min; B: Paddle pH 4,5; E: Paddle pH 5,5 (n=3 ± 95 % KI)	91
Abbildung 3-23: Verlauf des pH-Wertes nach Zugabe von 240 mg Weinsäure zu 900 ml Puffer [n=3]	92
Abbildung 3-24: Formulierung A: Vergleich der Freisetzungen mit festen Pumpgeschwindigkeiten mit der Absorptionskurve der Arzneiform. A: 100 ml/min; B: 10 ml/min; C: 4 ml/min; D: in vivo Situation [n=3 ± 95 % KI]	93
Abbildung 3-25: Arzneiform A: Vergleich unterschiedlicher Pumpprogramme bei pH 5.5; B: in vivo Absorptionskurve; senkrechte Linien: Wechsel der Pumpgeschwindigkeit bei Freisetzungskurve E [n=2]	94
Abbildung 3-26: Arzneiform B: Freisetzung mit in Tabelle 1 festgelegtem Pumpprogramm. A: Freisetzung bei pH 5,5; C: Freisetzung bei pH 6; B: in vivo Absorption; senkrechte Linien: Wechsel der Pumpgeschwindigkeit e [n=2]	95
Abbildung 3-27: Arzneiform B: Freisetzung mit Pumpprogramm bei pH 6. A: in vitro Freisetzung; schwarz: in vivo Absorption; senkrechte Linien: Wechsel der Pumpgeschwindigkeit [n=2]	96
Abbildung 3-28: Arzneiform B: Freisetzungsprofile bei unterschiedlichen pH-Verläufen. C: in vivo Absorption; senkrechte Linien: Zeitpunkte der Änderungen von Pumpgeschwindigkeit und pH-Wert [A, B, E: n=2; D n=3]	97
Abbildung 3-29: Arzneiform A: Freisetzungen bei unterschiedlichen pH-Verläufen. D: i vivo Absorptionskurve; senkrechte Linien: Zeitpunkte der Änderungen von Pumpgeschwindigkeit und pH-Wert [A, B: n=2; C n=3 ± 95 % KI]	98

Abbildung 3-30: Arzneiform B: A: in vitro Freisetzung; B: in vivo Absortionskurve; senkrechte Linien: Zeitpunkte der Änderungen von Pumpgeschwindigkeit und pH-Wert [$n=3 \pm 95 \% \text{ KI}$]	100
Abbildung 3-31: Arzneiform C: Arzneiform B: Freisetzung mit der entwickelten Methode. A: in vitro Freisetzung; B: in vivo Absorptionskurve; senkrechte Linien: Zeitpunkte der Änderungen von Pumpgeschwindigkeit und pH-Wert [$n=3 \pm 95 \% \text{ KI}$]	100
Abbildung 3-32: Levy-Plot über alle Arzneiformen. Schwarze Linie: Regressionsgerade	103
Abbildung 5-1:Residuenplot Theophyllin	118
Abbildung 5-2: Residuenplot der Apafant-HPLC-Kalibrierung	119
Abbildung 5-3: Residuenplot der BIXX-Kalibrierung (HPLC)	120
Abbildung 5-4:Residuenplit der BIXX-Kalibrierung (UV)	121

5.5 Verzeichnis der mathematischen Gleichungen

Gleichung 1-1: Erstes Fick'sches Gesetz	6
Gleichung 1-2: Absorptionszahl	8
Gleichung 1-3: Dissolutionszahl	8
Gleichung 1-4: Dosiszahl	9
Gleichung 1-5: Berechnung der absorbierten Fraktion	9
Gleichung 1-6: absorbierte Fraktion für BCS 2-Substanzen	9
Gleichung 1-7: f_2 -Test auf Ähnlichkeit zweier Dissolutionsprofile	15
Gleichung 1-8: Konzentrations-Zeit-Profil nach peroraler Applikation	18
Gleichung 1-9: Reaktion erster Ordnung	19
Gleichung 1-10: Bateman-Funktion	19
Gleichung 1-11: Berechnung des maximal absorbierten Anteils nach Ginski und Polli	28
Gleichung 2-1: Geometrisches Mittel	39
Gleichung 2-2: Allgemeine Gleichung für die UIR	39
Gleichung 2-3: Berechnung der AUC	40
Gleichung 2-4: Gleichung des mathematischen Modells zur Level A-Korrelation	41
Gleichung 2-5: effektiver Permeationskoeffizient	48
Gleichung 3-1: Eliminationskonstante im SPE-Modell	88

5.6 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1-1: Länge und relative Oberfläche der Darmabschnitte (Kararli 1995)	4
Tabelle 1-2: BCS-Klassen und die zu erwartende IVIVC	7
Tabelle 1-3: BCS-Klassen nach Ausmaß und Ort von Löslichkeit und Permeabilität	10
Tabelle 2-1: Zusammensetzung HBSS	46
Tabelle 3-1: Parameter des 3-exponentiellen Modells	53
Tabelle 3-2: Parameter des 2-exponentiellen Modelles	54
Tabelle 3-3: Pharmokokinetische Parameter der drei untersuchten Formulierungen	55
Tabelle 3-4: Rechenbeispiel für die zu erwartende permeierte Menge	58
Tabelle 3-5: Ergebnisse des Filter-Vergleichs ohne Zellen [n=3]	62
Tabelle 3-6: Ergebnisse des Filter-Vergleichs mit Zellen [n=3]	62
Tabelle 3-7: Untersuchte Hilfsstoffe	66
Tabelle 3-8: Ergebnisse der Funktionsprüfung für große Filter [n=3]	74
Tabelle 3-9: Pumpprogramme Arzneiform A / pH 5,5	94
Tabelle 3-10: Arzneiform B: Unterschiedliche Pump- und pH-Programme während der Methodenentwicklung	97
Tabelle 3-11: Arzneiform A: Unterschiedliche Pump- und pH-Programme während der Methodenentwicklung	99
Tabelle 3-12: Methode für SPE-Freisetzen	101
Tabelle 3-13: Vergleichsparameter für die IVIVR	101
Tabelle 3-14: Steigungen und R ² -Werte der Levy-Plots	102
Tabelle 5-1: Verwendete Software und Geräte	114
Tabelle 5-2: Medien der Zellkultur	114
Tabelle 5-3: Materialien der Zellkultur	114
Tabelle 5-4: HPLC-Methode Theophyllin	118
Tabelle 5-5: Kalibrierung Theophyllin	118
Tabelle 5-6: HPLC-Methode Apafant	119

Tabelle 5-7: Kalibrierung Apafant	119
Tabelle 5-8: HPLC-Methode BIXX	120
Tabelle 5-9: Kalibrierung BIXX (HPLC)	120
Tabelle 5-10: UV-Vis-Methode BIXX	121
Tabelle 5-11: Kalibrierung BIXX (UV)	121

6 Literaturverzeichnis

Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. 1995, "A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability", *Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 3, pp. 413-420.

Anderberg, E. K., Lindmark, T., & Artursson, P. 1993, "Sodium caprate elicits dilatations in human intestinal tight junctions and enhances drug absorption by the paracellular route", *Pharmaceutical Research*, vol. 10, no. 6, pp. 857-864.

Anderberg, E. K., Nystrom, C., & Artursson, P. 1992, "Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: Effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 81, no. 9, pp. 879-887.

Artursson, P. 1991, "Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa", *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 8, no. 4, pp. 305-330.

Artursson, P. & Borchardt, R. T. 1997, "Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond", *Pharmaceutical Research*, vol. 14, no. 12, pp. 1655-1658.

Artursson, P. & Karlsson, J. 1991, "Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (CACO-2) cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 175, no. 3, pp. 880-885.

Artursson, P., Ungell, A. L., & Lofroth, J. E. 1993, "Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: Cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments", *Pharmaceutical Research*, vol. 10, no. 8, pp. 1123-1129.

Artursson, P., Karlsson, J., Ocklind, G., & Schipper, N. Studying transport processes in absorptive epithelia. *Epithelial Cell Cult.* 111-133. 1996.

Assubate, F. N. Employing sequential injection analysis technique and chemometric optimization approach for developing diltiazem assay method. *Yaowu Shipin Fenxi* 17[6], 408-414. 2009.

Aungst, B. J. 2000, "Intestinal permeation enhancers", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 89, no. 4, pp. 429-442.

Balimane, P. V., Patel, K., Marino, A., & Chong, S. Utility of 96 well Caco-2 cell system for increased throughput of P-gp screening in drug discovery. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 58[1], 99-105. 2004.

Boni, J. E., Brickl, R. S., & Dressman, J. 2007, "Is bicarbonate buffer suitable as a dissolution medium?", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 59, no. 10, pp. 1375-1382.

Bouchoucha, M., Devroede, G., Dorval, E., Faye, A., Arhan, P., & Arzac, M. 2006, "Different segmental transit times in patients with irritable bowel syndrome and "normal" colonic transit time: Is there a correlation with symptoms?", *Techniques in Coloproctology*, vol. 10, no. 4, pp. 287-295.

Brouwers, J., Tack, J., Lammert, F., & Augustijns, P. 2006, "Intraluminal drug and formulation behavior and integration in in vitro permeability estimation: A case study with amprenavir", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 95, no. 2, pp. 372-383.

Buch, P., Langguth, P., Kataoka, M., & Yamashita, S. IVIVC in oral absorption for fenofibrate immediate release tablets using a dissolution/permeation system. *J.Pharm.Sci.* 98[6], 2001-2009. 2009.

Cano, C., Zornoza, T., Granero, L., & Polache, A. 2005, "Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: A target for drug delivery", *Current Drug Delivery*, vol. 2, no. 1, pp. 9-22.

Cao, G. I., Wang, J., Liu, Y., Wang, Y., Zhang, S. z., & Pan, W. s. In vivo and in vitro evaluation of push-pull osmotic pump-controlled release tablet of vinpocetine using numerical deconvolution technique. *Zhongguo Xinyao Zazhi* 17[5], 405-408. 2008.

Chan, K. K. H., Langenbucher, F., & Gibaldi, M. Evaluation of in vivo drug release by numerical deconvolution using oral solution data as weighting function. *J.Pharm.Sci.* 76[6], 446-450. 1987.

Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M. G., & Zweibaum, A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 48[7], 1936-1942. 1988.

Chen, M. L., Straughn, A. B., Sadrieh, N., Meyer, M., Faustino, P. J., Ciavarella, A. B., Meibohm, B., Yates, C. R., & Hussain, A. S. 2007, "A modern view of excipient effects on bioequivalence: Case study of sorbitol", *Pharmaceutical Research*, vol. 24, no. 1, pp. 73-80.

Corrigan, O. I. 1997, "The biopharmaceutic drug classification and drugs administered in extended release (ER) formulations", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 423, pp. 111-128.

Cutler, D. J. Numerical deconvolution by least squares: use of polynomials to represent the input function. *J Pharmacokinet Biopharm* 6[3], 243-263. 1978a.

Cutler, D. J. Numerical deconvolution by least squares: use of prescribed input functions. *J Pharmacokinet Biopharm* 6[3], 227-241. 1978b.

DeSesso, J. M. & Jacobson, C. F. 2001, "Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 39, no. 3, pp. 209-228.

Dintaman, J. M. & Silverman, J. A. Inhibition of P-glycoprotein by D-alpha -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS). *Pharm.Res.* 16[10], 1550-1556. 1999.

Dressman, J. B., Amidon, G. L., Reppas, C., & Shah, V. P. 1998b, "Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms", *Pharmaceutical Research*, vol. 15, no. 1, pp. 11-22.

Dressman, J. B., Amidon, G. L., Reppas, C., & Shah, V. P. 1998a, "Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms", *Pharmaceutical Research*, vol. 15, no. 1, pp. 11-22.

Dressman, J. B. & Reppas, C. 2000, "In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 11, no. SUPPL. 2.

Dressman, J. B., Berardi, R. R., Dermentzoglou, L. C., Russell, T. L., Schmaltz, S. P., Barnett, J. L., & Jarvenpaa, K. M. Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharm.Res.* 7[7], 756-761. 1990.

European Pharmacopoeia. 2.9.3 Dissolution test for solid dosage forms. 2010.

Evans, D. F., Pye, G., Bramley, R., Clark, A. G., Dyson, T. J., & Hardcastle, J. D. 1988, "Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects", *Gut*, vol. 29, no. 8, pp. 1035-1041.

FDA. Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations. 1997a.

FDA. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. 1997b.

FDA. SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms. 1997c.

FDA. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutical Classification System. 2000.

Fogh, J., Fogh, J. M., & Orfeo, T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59[1], 221-226. 1977.

Galia, E., Nicolaidis, E., rter, D., benberg, R., Reppas, C., & Dressman, J. B. 1998, "Evaluation of various dissolution media for predicting In vivo performance of class I and II drugs", *Pharmaceutical Research*, vol. 15, no. 5, pp. 698-705.

Gido, C., Langguth, P., & Mutschler, E. 1994, "Predictions of in vivo plasma concentrations from in vitro release kinetics: Application to doxepin parenteral (I.M.) suspensions in lipophilic vehicles in dogs", *Pharmaceutical Research*, vol. 11, no. 6, pp. 800-808.

Ginski, M. J. & Polli, J. E. 1999a, "Prediction of dissolution-absorption relationships from a dissolution/Caco-2 system", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 177, no. 1, pp. 117-125.

Ginski, M. J., Taneja, R., & Polli, J. E. 1999b, "Prediction of dissolution-absorption relationships from a continuous dissolution/Caco-2 system", *AAPS pharmSci [electronic resource]*, vol. 1, no. 2.

Gruber, P., Longer, M. A., & Robinson, J. R. Some biological issues in oral, controlled drug delivery. *Adv.Drug Delivery Rev.* 1[1], 1-18. 1987.

Grundy, J. S., Anderson, K. E., & Foster, R. T. 1997a, "Studies on dissolution testing of the nifedipine gastrointestinal therapeutic system. I. Description of a two-phase in vitro dissolution test", *Journal of Controlled Release*, vol. 48, no. 1, pp. 1-8.

Grundy, J. S., Anderson, K. E., Rogers, J. A., & Foster, R. T. 1997b, "Studies on dissolution testing of the nifedipine gastrointestinal therapeutic system. II. Improved in vitro-in vivo correlation using a two- phase dissolution test", *Journal of Controlled Release*, vol. 48, no. 1, pp. 9-17.

He, X., Kadomura, S., Takekuma, Y., Sugawara, M., & Miyazaki, K. 2004, "A New System for the Prediction of Drug Absorption Using a pH-Controlled Caco-2 Model: Evaluation of pH-Dependent Soluble Drug Absorption and pH-Related Changes in Absorption", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 93, no. 1, pp. 71-77.

He, X., Sugawara, M., Kobayashi, M., Takekuma, Y., & Miyazaki, K. 2003, "An in vitro system for prediction of oral absorption of relatively water-soluble drugs and ester prodrugs", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 263, no. 1-2, pp. 35-44.

Hidalgo, I. J., Raub, T. J., & Borchardt, R. T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96[3], 736-749. 1989.

Hidalgo, I. J. & Li, J. Carrier-mediated transport and efflux mechanisms in Caco-2 cells. *Adv.Drug Delivery Rev.* 22[1,2], 53-66. 1996.

Hugger, E. D., Novak, B. L., Burton, P. S., Audus, K. L., & Borchardt, R. T. 2002a, "A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity in vitro", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 91, no. 9, pp. 1991-2002.

Hugger, E. D., Audus, K. L., & Borchardt, R. T. Effects of poly(ethylene glycol) on efflux transporter activity in Caco-2 cell monolayers. *J.Pharm.Sci.* 91[9], 1980-1990. 2002b.

Ingels, F., Beck, B., Oth, M., & Augustijns, P. 2004, "Effect of simulated intestinal fluid on drug permeability estimation across Caco-2 monolayers", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 274, no. 1-2, pp. 221-232.

Ingels, F., Deferme, S., Delbar, N., Oth, M., & Augustijns, P. 2002, "Implementation of the Caco-2 cell culture model as a predictive tool for the oral absorption of drugs. In-house evaluation procedures", *Journal de Pharmacie de Belgique*, vol. 57, no. 6, pp. 153-158.

Kararli, T. T. 1989, "Gastrointestinal absorption of drugs", *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 6, no. 1, pp. 39-86.

Kararli, T. T. 1995, "Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals", *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, vol. 16, no. 5, pp. 351-380.

Karlsson, J. & Artursson, P. 1991, "A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 71, no. 1-2, pp. 55-64.

Kataoka, M., Masaoka, Y., Sakuma, S., & Yamashita, S. 2006, "Effect of food intake on the oral absorption of poorly water-soluble drugs: In vitro assessment of drug dissolution and permeation assay system", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 95, no. 9, pp. 2051-2061.

Kataoka, M., Masaoka, Y., Yamazaki, Y., Sakane, T., Sezaki, H., & Yamashita, S. 2003, "In Vitro System to Evaluate Oral Absorption of Poorly Water-Soluble Drugs: Simultaneous Analysis on Dissolution and Permeation of Drugs", *Pharmaceutical Research*, vol. 20, no. 10, pp. 1674-1680.

Kobayashi, M., Sada, N., Sugawara, M., Iseki, K., & Miyazaki, K. 2001, "Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 221, no. 1-2, pp. 87-94.

Koehne-Voss, S. 2006, *Estimation of input and response functions when performing numerical convolution and deconvolution with pharmacokinetic data*, Dissertationsschrift der Universität Bremen.

Kossena, G. A., Charman, W. N., Boyd, B. J., Dunstan, D. E., & Porter, C. J. H. 2004, "Probing Drug Solubilization Patterns in the Gastrointestinal Tract after Administration of Lipid-Based Delivery Systems: A Phase Diagram Approach", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 93, no. 2, pp. 332-348.

Kostewicz, E. S., Wunderlich, M., Brauns, U., Becker, R., Bock, T., & Dressman, J. B. Predicting the precipitation of poorly soluble weak bases upon entry in the small intestine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56[1], 43-51. 2003.

Langenbucher, F. Numerical convolution/deconvolution as a tool for correlating in vitro with in vivo drug availability. *Pharm.Ind.* 44[11], 1166-1172. 1982b.

Langenbucher, F. Numerical convolution/deconvolution as a tool for correlating in vitro with in vivo drug availability. *Pharm.Ind.* 44[11], 1166-1172. 1982a.

Larsen, D. B., Joergensen, S., Olsen, N. V., Hansen, S. H., & Larsen, C. In vivo release of bupivacaine from subcutaneously administered oily solution. Comparison with in vitro release. *J.Controlled Release* 81[1-2], 145-154. 2002.

Larsson, M., Minekus, M., & Havenaar, R. Estimation of the bioavailability of iron and phosphorus in cereals using a dynamic in vitro gastrointestinal model. *J.Sci.Food Agric.* 74[1], 99-106. 1997.

Le Ferrec, E., Chesne, C., Artusson, P., Brayden, D., Fabre, G., Gires, P., Guillou, F., Rousset, M., Rubas, W., & Scarino, M. L. In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern Lab Anim* 29[6], 649-668. 2001.

Leusch, A., Volz, A., Muller, G., Wagner, A., Sauer, A., Greischel, A., & Roth, W. Altered drug disposition of the platelet-activating factor antagonist apafant in *mdr1a* knockout mice. *Eur.J.Pharm.Sci.* 16[3], 119-128. 2002.

Lobenberg, R., Kramer, J., Shah, V. P., Amidon, G. L., & Dressman, J. B. 2000, "Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: dissolution behavior of glibenclamide", *Pharm.Res.*, vol. 17, no. 4, pp. 439-444.

Loo, T. W., Bartlett, M. C., & Clarke, D. M. The Drug-Binding Pocket of the Human Multidrug Resistance P-Glycoprotein Is Accessible to the Aqueous Medium. *Biochemistry* 43[38], 12081-12089. 2004.

Malagelada, J. R., Longstreth, G. F., Summerskill, W. H., & Go, V. L. Measurement of gastric functions during digestion of ordinary solid meals in man. *Gastroenterology* 70[2], 203-210. 1976.

Malagelada, J. R., Robertson, J. S., Brown, M. L., Remington, M., Duenes, J. A., Thomforde, G. M., & Carryer, P. W. Intestinal transit of solid and liquid components of a meal in health. *Gastroenterology* 87[6], 1255-1263. 1984.

Marroum, P. 2007, *Validation of IVIVCs, Applications and Setting Release Specifications*, APV-Course on IVIVC; Heidelberg.

Moore, J. W. & Flanner, H. H. 1996, "Mathematical Comparison of Dissolution Profiles", *Pharmaceutical Technology*, vol. 20, no. 6, pp. 64-74.

Motz, S. A. 2007, *Combined Assessment of dissolution and epithelial permeability of solid oral dosage forms*, Dissertationsschrift der Universität Saarbrücken.

Motz, S. A., Klimundova, J., Schaefer, U. F., Balbach, S., Eichinger, T., Solich, P., & Lehr, C. M. 2007a, "Automated measurement of permeation and dissolution of propranolol HCl tablets using sequential injection analysis", *Analytica Chimica Acta*, vol. 581, no. 1, pp. 174-180.

Motz, S. A., Schaefer, U. F., Balbach, S., Eichinger, T., & Lehr, C. M. 2007b, "Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 66, no. 2, pp. 286-295.

Nicolaides, E., Galia, E., Efthymiopoulos, C., Dressman, J. B., & Reppas, C. 1999, "Forecasting the in vivo performance of four low solubility drugs from their in vitro dissolution data", *Pharmaceutical Research*, vol. 16, no. 12, pp. 1876-1882.

Ovesen, L., Bendtsen, F., Tage-Jensen, U., Pedersen, N. T., Gram, B. R., & Rune, S. J. Intraluminal pH in the stomach, duodenum, and proximal jejunum in normal subjects and patients with exocrine pancreatic insufficiency. *Gastroenterology* 90[4], 958-962. 1986.

Parojcic, J., Djuric, Z., Jovanovic, M., Ibric, S., Kilibarda, V., Jovanovic, D., & Evic, I. K. Biopharmaceutical characterization of sustained release matrix tablets based on novel carbomer polymers: Formulation and in vivo investigation. *Eur.J Drug Metab. Pharmacokinet.* 30[1-2], 99-104. 2005.

Patel, N., Forbes, B., Eskola, S., & Murray, J. 2006, "Use of simulated intestinal fluids with Caco-2 cells and rat ileum", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 32, no. 2, pp. 151-161.

Pedersen, P. V. Pharmacokinetic analysis by linear system approach. I: Cimetidine bioavailability and second peak phenomenon. *J.Pharm.Sci.* 70[1], 32-38. 1981.

Persson, E. M., Gustafsson, A. S., Carlsson, A. S., Nilsson, R. G., Knutson, L., Forsell, P., Hanisch, G., Lennerna?s, H., & Abrahamsson, B. 2005, "The effects of food on the dissolu-

tion of poorly soluble drugs in human and in model small intestinal fluids", *Pharmaceutical Research*, vol. 22, no. 12, pp. 2141-2151.

Pfefferle, M. L. 2006, *Entwicklung einer kombinierten Dissolutions/Resorptions-Apparatur zur Untersuchung des Hilfsstoffeinflusses auf die Resorption von Arzneistoffen am Beispiel eines Theophyllin-Eudragit RS-Matrixsystems*, Diplomarbeit der Universität Tübingen.

Pharsight 2007, *WinNonline User's Guide 5.2*, Pharsight, St. Louis, Missouri.

Pillay, V. & Fassihi, R. 1999, "Unconventional dissolution methodologies", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 88, no. 9, pp. 843-851.

Raiman, J., lehto, S., Yritys, K., Junginger, H. E., & nen, J. 2003, "Effects of various absorption enhancers on transport of clodronate through Caco-2 cells", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 261, no. 1-2, pp. 129-136.

Rege, B. D., Kao, J. P. Y., & Polli, J. E. 2002, "Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 16, no. 4-5, pp. 237-246.

Rege, B. D., Yu, L. X., Hussain, A. S., & Polli, J. E. 2001, "Effect of common excipients on Caco-2 transport of low-permeability drugs", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 90, no. 11, pp. 1776-1786.

Reppas, C., Lacey, L. F., Keene, O. N., Macheras, P., & Bye, A. Evaluation of different metrics as indirect measures of rate of drug absorption from extended release dosage forms at steady-state. *Pharm Res* 12[1], 103-107. 1995.

Ritschel, W. A. 1991, "Targeting in the gastrointestinal tract: New approaches", *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, vol. 13, no. 5, pp. 313-336.

Rouge, N., Buri, P., & Doelker, E. 1996, "Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 136, no. 1-2, pp. 117-139.

Sakaeda, T. MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab. Pharmacokinet.* 20[6], 391-414. 2005.

Schulte, L., Westerhoff, K., Wilke, A., Schubert-Zsilavec, M., & Wurglics, M. 2003, "Development of a high-performance-liquid-chromatographic method for the determination of biapigenin in biorelevant media", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 33, no. 1, pp. 53-60.

Shah, P., Jogani, V., Bagchi, T., & Misra, A. 2006, "Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption", *Biotechnology Progress*, vol. 22, no. 1, pp. 186-198.

Shah, V. P., Tsong, Y., Sathe, P., & Liu, J. P. 1998, "In vitro dissolution profile comparison-Statistics and analysis of the similarity factor, f_2 ", *Pharmaceutical Research*, vol. 15, no. 6, pp. 889-896.

Sirisuth, N., Augsburger, L. L., & Eddington, N. D. 2002, "Development and validation of a non-linear IVIVC model for a diltiazem extended release Formulation", *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, vol. 23, no. 1, pp. 1-8.

Skelly, J. P., Amidon, G. L., Barr, W. H., Benet, L. Z., Carter, J. E., Robinson, J. R., Shah, V. P., & Yacobi, A. 1990, "In vitro and in vivo testing and correlation for oral controlled/modified-release dosage forms", *Pharmaceutical Research*, vol. 7, no. 9, pp. 975-982.

Smith, R. N., Hansch, C., & Ames, M. M. 1975, "Selection of a reference partitioning system for drug design work", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 64, no. 4, pp. 599-606.

Staib, A. H., Loew, D., & Harder, S. 1986, "Measurement of theophylline absorption from different regions of the gastro-intestinal tract using a remote controlled drug delivery device", *European Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 30, no. 6, pp. 691-697.

Sugawara, M., Kadomura, S., He, X., Takekuma, Y., Kohri, N., & Miyazaki, K. 2005, "The use of an in vitro dissolution and absorption system to evaluate oral absorption of two weak bases in pH-independent controlled-release formulations", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 26, no. 1, pp. 1-8.

Sun, D., Yu, L. X., Hussain, M. A., Wall, D. A., Smith, R. L., & Amidon, G. L. 2004, "In vitro testing of drug absorption for drug 'developability' assessment: Forming an interface between in vitro preclinical data and clinical outcome", *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, vol. 7, no. 1, pp. 75-85.

Takaai, M., Sakata, J., Ishida, K., Taguchi, M., & Hashimoto, Y. Mechanisms for transport of methotrexate across apical and basolateral membranes in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Iryo Yakugaku* 36[2], 63-71. 2010.

Thanou, M., Verhoef, J. C., & Junginger, H. E. 2001, "Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 52, no. 2, pp. 117-126.

Vasiliki, V., Pinto, P. C. A. G., Saraiva, M. L., & Lima, J. L. F. C. Sequential injection determination of meloxicam in pharmaceutical formulations with spectrophotometric detection. *Can.J.Anal.Sci.Spectrosc.* 52[6], 351-358. 2007.

Venema, K., Van Nuenen, M., Smeets-Peeters, M., Minekus, M., & Havenaar, R. TNO's in vitro large intestinal model: an excellent screening tool for functional food and pharmaceutical research. *Ernaehrung (Vienna)* 24[12], 558-564. 2000.

Voegele, D. Practical application of the concept of mean times in biopharmaceutics. *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.* 6[10], 597-604. 1984.

Wagner, J. G. Application of the Wagner-Nelson absorption method to the two-compartment open model. *J Pharmacokinet Biopharm* 2[6], 469-486. 1974.

Wagner, J. G. Application of the Loo-Riegelman absorption method. *J Pharmacokinet Biopharm* 3[1], 51-67. 1975.

Weitschies, W. 2001, "Drug forms: A journey through the digestive tract", *Pharmazeutische Zeitung*, vol. 146, no. 14, pp. 10-16.

Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H., & Tokuda, H. 2000, "Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 10, no. 3, pp. 195-204.

Yee, S. 1997, "In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man - Fact or myth", *Pharmaceutical Research*, vol. 14, no. 6, pp. 763-766.

Zerrouk, N., Corti, G., Ancillotti, S., Maestrelli, F., Cirri, M., & Mura, P. 2006, "Influence of cyclodextrins and chitosan, separately or in combination, on glyburide solubility and permeability", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 62, no. 3, pp. 241-246.

7 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Ammon, Beitz, Beyer, Breier, Daniels, Drews, Gauglitz, Großmann, Heinicke, Heide, Kovar, Laufer, Lemberg, Li, Lindequist, Lißke, Linder, Ruth, Sausbier, Schmidt, Schreiber, Schultz, Spitzer, Wahl, Werz.

8 Lebenslauf

5. April 1977	geboren in Buchloe
Juni 1997	Allgemeine Hochschulreife in Immenstadt
August 1997 - September 1998	Zivildienst
September 1998 - Oktober 1999	Ausbildung zum Brauer und Mälzer
Oktober 1999	Beginn des Studiums der Pharmazie an der Universität Greifswald
April 2000	Wechsel an die Universität Tübingen
April 2004	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Oktober 2005	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dezember 2005 - Mai 2006	Arbeit an der Diplomarbeit am Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. M. A. Wahl
Juli 2006	Diplomprüfung
Juli 2006 - Dezember 2006	Pharmaziepraktikant in der Apotheke Petri in Gelnhausen
Februar 2007	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung Approbation zum Apotheker
April 2007 - Mai 2010	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Tübingen Beginn der Dissertation mit dem Titel: „Möglichkeiten der simultanen Untersuchung von Freisetzung und Absorption schwer-wasserlöslicher Arzneistoffe aus festen oralen Darreichungsformen durch biorelevante in vitro Modelle“