

**“Einfluss von Hilfsstoffen auf die
Bioverfügbarkeit von Substanzen der BCS
Klasse III“**

Dissertation
zur Erlangung des Grades

“Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Christian Heinen

geb. in Rodalben

Mainz, den 30.12.2013

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Januar 2014

D77

Nur wenige wissen, wie viel man wissen muss, um zu wissen, wie wenig man weiß.

Werner Heisenberg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	11
1. Einleitung und Zielsetzung der Dissertation	15
1.1. Resorption im Gastrointestinaltrakt.....	22
1.2. Interzelluläre Verbindungen.....	23
1.3. Parazellulärer Transport.....	24
1.4. Transzellulärer Transport	25
1.4.1. Passiver Transport	25
1.4.2. Aktiver Transport.....	26
1.4.3. Zytotische Prozesse	26
1.5. Einflüsse von Hilfsstoffen	26
1.5.1. Überblick	26
1.5.2. Veränderung der intestinalen Transitzeit	31
1.5.3. Einfluss durch Interaktionen mit der Membran.....	36
1.5.4. Luminale Reaktionen.....	55
1.5.5. Andere Einflüsse.....	60
2. Mechanismus der unerwarteten Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Trosipiumchlorid enthaltenen Polyelektrolytkomplexen	63
2.1. Einleitung.....	63
2.2. Material und Methoden	65
2.2.1. Materialien	65
2.2.2. Komplexierung	66
2.2.3. Komplex-Charakterisierung.....	66
2.2.4. In-vivo-Studien	67
2.2.5. Ligated-Loop-Studien	68
2.2.6. Zellkultur.....	68
2.2.7. Caco-2-Transport-Experimente	69
2.2.8. Entnahme und Präparation des Rattengewebes	70
2.2.9. Präparation der Humandarm-Resektate.....	70
2.2.10. Ussing-Kammer	71

2.2.11. Analytische Methoden	75
2.2.12. Statistische Methoden	76
2.3. Ergebnisse	77
2.3.1. Charakterisierung der Komplexe.....	77
2.3.2. In-vivo-Studien	78
2.3.3. Ligated-Loop-Studien	79
2.3.4. Caco-2-Transport-Experimente	80
2.3.5. Transport Experimente mit Rattenjejunum an der Ussing-Kammer	82
2.4. Diskussion und Fazit	87
3. Ionenpaarbildung mit Gallensalzen verändert die intestinale Permeabilität und erklärt die Nahrungsmittelinteraktion der BCS Klasse III Substanz Trospiumchlorid	90
3.1. Einleitung.....	90
3.2. Material und Methoden	93
3.2.1. Materialien	93
3.2.2. Enzymatischer Gallensalz-Nachweis	93
3.2.3. ¹ H-NMR.....	94
3.2.4. Isothermale Titrationskalorimetrie	95
3.2.5. Ermittlung des apparenten Verteilungskoeffizienten	95
3.2.6. Zellkultur.....	96
3.2.7. Caco-2-Transport-Experimente	96
3.2.8. Entnahme und Präparation des Rattengewebes	96
3.2.9. Herstellung der Olivenöl-Emulsion.....	96
3.2.10. Ussing-Kammer-Transport-Experimente	97
3.2.11. Analytische Methoden	97
3.2.12. Statistische Methoden	98
3.3. Ergebnisse	99
3.3.1. Enzymatischer Gallensalz-Nachweis	99
3.3.2. ¹ H-NMR.....	99
3.3.3. Isothermale Titrationskalorimetrie	99
3.3.4. Ermittlung des apparenten Verteilungskoeffizienten	103
3.3.5. Caco-2-Transport-Experimente	104
3.3.6. Ussing-Kammer-Transport-Experimente	104

3.4. Diskussion und Fazit	108
4. Einfluss des Absorptionsmodulators Eudragit E auf die orale Absorption der BCS-Klasse-III-Substanz Trosipiumchlorid in vivo in Ratten	113
4.1. Einleitung.....	113
4.2. Material und Methoden	114
4.2.1. Materialien	114
4.2.2. Tiere.....	115
4.2.3. Loop-Studien bei Ratten.....	116
4.2.4. In-vivo-Studien bei Ratten	116
4.2.5. Blutentnahmen und Probenbehandlung.....	116
4.2.6. Analytische Methoden	117
4.2.7. Ermittlung pharmakokinetischer Parameter.....	117
4.2.8. Statistische Methoden	118
4.3. Ergebnisse	119
4.3.1. Plasmadaten bei direkter Applikation in das Jejunum (Ligated-Loop-Studien)	119
4.3.2. Plasmadaten bei Applikation mit der Schlundsonde	119
4.3.3. Ergebnisse der kompartmentellen Analyse der Inputparameter mit Mean-times-Analyse	121
4.3.4. Vergleich der Dispositionsparameter und der Absorptionscharakteristika von Ratte und Mensch	123
4.4. Diskussion und Fazit	124
5. Effekt des Permeationsverbesserers Chitosan-Hydrochlorid auf die Absorption von Aciclovir in vitro und in vivo	126
5.1. Einleitung.....	126
5.2. Material und Methoden	127
5.2.1. Materialien	127
5.2.2. Zellkultur.....	128
5.2.3. Caco-2-Transport-Experimente	128
5.2.4. Präparation des Rattengewebes	129
5.2.5. Ussing-Kammer-Transport-Experimente	129
5.2.6. Loop-Studien bei Ratten.....	129
5.2.7. Analytische Methoden	129
5.2.8. Berechnung der apparenten Permeabilität	131

5.2.9. Berechnung der pharmakokinetischen Parameter	131
5.2.10. Statistische Methoden	131
5.3. Ergebnisse	132
5.3.1. Caco-2-Transport-Experimente	132
5.3.2. Ussing-Kammer Transport-Experimente	135
5.3.3. Ligated-Loop-Studien	138
5.4. Diskussion und Fazit	139
6. Zusammenfassung	143
7. Literatur	147
8. Anhang	167
8.1. Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien	167
8.2. Zusammensetzung der verwendeten Puffer	167
8.3. Pharmakokinetische Parameter aus den Experimenten mit Eudragit E	169
9. Publikationen und Posterpräsentationen	172
10. Curriculum vitae	172

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AO	Antisense-Oligonukleotid
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
AVK	Apparenter Verteilungskoeffizient
BB	Bovine bile (Rindergalle)
BCS	Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem
BEP	Bile extract porcine (Schweinegalle)
C10	Natriumdecanoat
C12	Natriumdodecanoat
C14	Natriumtetradecanoat
C6	Natriumhexanoat
C8	Natriumoctanoat
CC	Croscarmellose
CDOC	Chenodesoxycholol
C _{max}	maximale Plasmakonzentration
CP	Crospovidon
CYP	Cytochrom-P-450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOC	Desoxycholol
DOSS	Diocetylnatriumsulfosuccinat
dPe	Eigenpotentialdifferenz

Abkürzungen

DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
Eudragit E	kationisches Copolymer bestehend aus Dimethylaminoethyl-Methacrylat, Butyl-Methacrylat und Methyl-Methacrylat
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
GC	Glycocholol
GCDC	Glycochenodesoxycholol
GDOC	Glycodesoxycholol
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	Stromstärke
IE	Internationale Einheit
IPC	Ionenpaarkomplexierung
ISDN	Isosorbiddinitrat
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
KBR	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer
LC/MS/MS	Liquid Chromatography / Mass Spectrometry / Mass Spectrometry
LCC	Lauroylcarnitinchlorid
LMWH	Low Molecular Weight Heparin

MC	Methylcellulose
MCC	Carboxymethylchitosan
MCG	mittelkettige Glyceride
MCP	Metoclopramid
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MRP	Multidrug Resistance Protein
Na/K-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
Na-C	Natriumcholat
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
Na-DOC	Natriumdesoxycholat
NaHC	Natriumhydrogencarbonat
NP	Nanopartikel
NSC	N-succinyl-Chitosan
NSG	Natriumstärkeglycolat
P	Wahrscheinlichkeit
P_{app}	Apparente Permeabilität
PBS	Phosphate buffered saline
PCC	Palmitoyl-DL-Carnitinchlorid
PD	Potentialdifferenz
PEG	Polyethylenglycol
PGP	P-Glykoprotein
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
POE	Polyoxyethylenether
QG	Quarternisierungsgrad
R	Widerstand

Abkürzungen

R123	Rhodamin 123
RP	Reversed Phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAC	Natrium-N-(8-(2-hydroxybenzoyl)amino)caprylat
SNOCC	N-Sulfonato-N,O-Carboxymethylchitosan
TBuMA	Tributylmethylammonium
TC	Taurocholat
TCDC	Taurochenodesoxycholat
TDOC	Taurodesoxycholat
TEA	Tetraethylammonium
TEER	Transepithelialer Widerstand
TPGS	Tocopherylpolyethylenglycolsuccinat
TJ	Tight Junction
T _{max}	Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration
TMC	Trimethylchitosan
TMC-Cys	Cystein-Trimethylchitosan
UDOC	Ursodesoxycholat
WHO	World Health Organization
ZO	Zonula occludens

1. Einleitung und Zielsetzung der Dissertation

Einfluss von Hilfsstoffen auf die Bioverfügbarkeit von oral applizierten Wirkstoffen in festen IR-Formulierungen

Auf dem Weg zum Zielkompartiment, welches in den meisten Fällen der Blutkreislauf darstellt, muss eine oral applizierte Arzneiform mehrere Prozesse durchlaufen. Dem Zerfall und der Freisetzung, die bei IR-Arzneiformen vollständig im Magen ablaufen sollten, folgt die Absorption während der Passage des Dünndarms. Nach dem Transport über die Pfortader zur Leber kann es noch zu einer Verstoffwechslung durch den First-Pass-Effekt kommen, bevor der Wirkstoff in den Blutkreislauf gelangt. Diese Prozesse können auf verschiedene Arten durch die Auswahl der in einer Arzneiform enthaltenen Hilfsstoffe beeinflusst werden. Grundsätzlich gilt es dabei, zwei Arten von Einflüssen zu unterscheiden.

Zum Einen meint dies die gezielte Beeinflussung durch Hilfsstoffe wie etwa die Verbesserung der Löslichkeit eines Wirkstoffes durch Zusatz von Cyclodextrinen [2] oder einen schnelleren Zerfall durch Zusatz von Sprengmitteln wie Croscarmellose [3]. Substanzen der BCS Klassen 3 und 4 können auch Permeationsverbesserer wie beispielsweise Natriumdecanoat zugesetzt sein, die durch Beeinflussung des Dünndarmepithels zu einer verbesserten Absorption beitragen sollen [4, 5]. Eine Verbesserung der Permeabilität kann auch durch Bindung eines Wirkstoffes an eine mukoadhäsive Substanz erreicht werden [6].

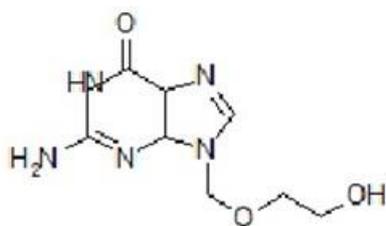
Die zweite Art betrifft den Einfluss durch einen Hilfsstoff, der eigentlich als inert angesehen wird. Beispielsweise kann eine verringerte intestinale Transitzeit zu einer geringeren Absorption eines Wirkstoffes führen, wie sie beispielsweise bei Verwendung von Mannitol als Hilfsstoff beschrieben wurde [7]. Die Inhibierung eines Transporters, der auch den Wirkstoff transportiert, kann ebenfalls Einfluss auf die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes haben. Zum Beispiel führte Polysorbat 80 zu einem vermehrten Transport von Ranitidin über eine Caco-2-Zellmembran [8]. Weiterhin können sich unlösliche Komplexe zwischen Hilfsstoffen und Wirkstoffen bilden. Als bekanntes Beispiel sind etwa die Komplexe aus Calciumsalzen mit Tetrazyklinen zu nennen [9]. Ein Überblick über die möglichen Einflüsse

von Hilfsstoffen wird im allgemeinen Teil der Arbeit gegeben, wobei die Verbesserung der Löslichkeit von Wirkstoffen und des Zerfalls von festen Arzneiformen, die bereits sehr intensiv untersucht wurden, sowie der Einfluss von Hilfsstoffen auf Transporter, der vor Kurzem in Reviews zusammengefasst wurde, weitgehend ausgespart werden. Im experimentellen Teil der Arbeit geht es um die gezielte Verbesserung der Permeabilität von Wirkstoffen durch Einfluss von Permeationenhancern und die Rolle der auch als Permeationenhancer eingesetzten Gallensalze auf die Absorption von Trosipium.

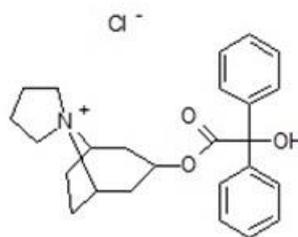
Zulassung von Biowaivern für Substanzen der BCS Klassen I und III

Sowohl beabsichtigte als auch ungewollte Effekte pharmazeutischer Hilfsstoffe auf die Bioverfügbarkeit sind insbesondere dann von Interesse, wenn ein Biowaiver für die Zulassung eines Generikums beantragt wird. Grundsätzlich ist die Beantragung eines BCS-basierten Biowaivers für Substanzen der BCS Klassen I und III möglich. In der neuen EU-Guideline zur Untersuchung der Bioäquivalenz für schnell freisetzende orale Arzneiformen wird der Einfluss von Hilfsstoffen bereits berücksichtigt. Darin wird festgeschrieben, dass BCS-basierte Biowaiver für BCS-Klasse 1 Substanzen nur dann angewandt werden dürfen, wenn die Hilfsstoffe nicht im Verdacht stehen, die Bioverfügbarkeit zu beeinflussen. Das Risiko eines relevanten, ungewollten Einflusses durch Hilfsstoffe ist bei Wirkstoffen der BCS Klasse 3 noch höher einzustufen. Die Regelung für diese Substanzen geht daher noch weiter. Es wird festgelegt, dass Biowaiver nur angewandt werden dürfen, wenn die Hilfsstoffe qualitativ gleich sind und sich quantitativ sehr ähneln [10]. Es ist daher überaus wichtig zu wissen, welche Prozesse durch Hilfsstoffe beeinflusst werden können und welche Hilfsstoffe einen solchen Einfluss ausüben. Darüber hinaus gilt es kritisch zu beurteilen, ob ein Modell, in dem ein Einfluss beobachtet wurde, sich wirklich eignet, um eine zuverlässige Aussage über einen Einfluss in vivo zu treffen. Verbote aufgrund übervorsichtiger Schlussfolgerungen sollten genauso vermieden werden wie Risiken aufgrund zu lockerer Regeln. Sowohl der allgemeine als auch der experimentelle Teil dieser Dissertation beschäftigen sich mit dieser Fragestellung.

Trospiumchlorid und Aciclovir als Modellsubstanzen der BCS Klasse 3



Aciclovir



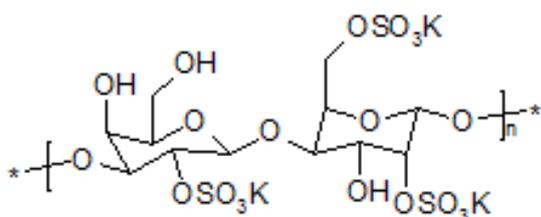
Trospiumchlorid

Trospiumchlorid wird seit Langem erfolgreich zur Behandlung der Dranginkontinenz eingesetzt. Es ist eine typische BCS Klasse 3 Substanz. Der Wirkstoff zeigt geringe Permeabilität und gute Löslichkeit sowie eine niedrige Bioverfügbarkeit von nur ca. 10% nach oraler Gabe. Die geringe Permeabilität beruht auf der quartären Amin-Struktur und dem vergleichsweise hohen Molekulargewicht von 427,96 Dalton. Darüber hinaus zeigt Trospium einen ausgeprägten negativen Food Effekt. Wenn es zusammen mit einer Mahlzeit eingenommen wird, verringert sich die Bioverfügbarkeit im Vergleich zur nüchternen Einnahme um mehr als 80% [11]. Ein Grund für den negativen Food Effekt ist möglicherweise das kleine Resorptionsfenster in den oberen Dünndarmabschnitten. Wenn Trospium im Magen aufgrund der höheren Viskosität nicht vollständig freigesetzt wird bzw. der Zerfall der Tablette nicht vollständig abläuft, führt dies zu einer geringeren Resorption im Dünndarm [12]. Eine Rolle könnte auch eine mögliche Bindung an Gallensalze spielen, wie sie für andere quartäre Ammoniumverbindungen beschrieben wurde [13]. Diese Möglichkeit wird im experimentellen Teil der Arbeit genauer untersucht.

Laut BCS Definition gilt eine Substanz als gut löslich, wenn sich deren höchste verfügbare Einzeldosis in 250 ml eines Puffers im pH-Bereich von 1-6,8 bei 37 +/-1°C vollständig löst [4]. Aciclovir ist wenig löslich in Wasser (ca. 2,5 mg/ml) und zeigt eine niedrige Permeabilität [14]. Aciclovir ist in einigen Ländern in schnell freisetzender Form nur in Stärken von bis zu 400 mg pro Tablette erhältlich. In diesem Fall würde es laut Definition der BCS Klasse 3 angehören. In einigen Ländern, unter anderem in Deutschland und den USA gibt es Aciclovir jedoch auch in der Stärke 800 mg pro Tablette. Laut Definition würde es dann der BCS Klasse 4 zugeordnet werden [15]. Die Bioverfügbarkeit im Menschen wird

nach oraler Gabe mit 10-30% angegeben. Die Absorption, die vor allem durch passive Diffusion erfolgt, verläuft langsam, variabel und unvollständig. C_{\max} wird nach ca. 2h erreicht. Das Medikament muss in einer für den Patienten unvorteilhaften Weise alle 4 Stunden eingenommen werden, weshalb es oft zu Problemen mit der Compliance kommt [15]. Im experimentellen Teil der Arbeit wird untersucht, ob durch Zusatz des Permeationenhancers Chitosan-HCl eine Verbesserung der Permeabilität in verschiedenen Systemen erreicht werden kann.

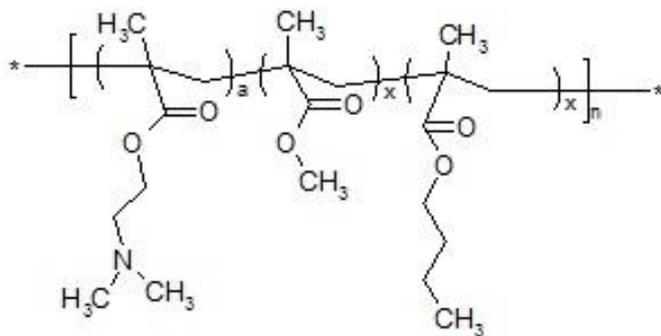
λ -Carrageen



Carrageen ist eine Sammelbezeichnung für sulfatierte Polysaccharide, die aus Rotalgen gewonnen werden. Carrageen wird in der Lebensmittelindustrie häufig als Verdickungsmittel benutzt. Es werden mehrere Typen von Carrageen unterschieden, die sich chemisch durch die Anzahl der Sulfatgruppen sowie durch ihren Anteil an Galactose und 3,6-Anhydrogalactose unterscheiden. Insbesondere κ -, ι - und λ -Carrageen spielen eine kommerzielle Rolle [16]. Eine gesundheitsschädliche Wirkung von Carrageen wird immer wieder diskutiert. Degradiertes Carrageen, sogenanntes Poligeen, welches bei hohen Temperaturen durch Zusatz von Säuren aus Carrageen hergestellt wird, wird im Tierversuch auch zur Erzeugung von Entzündungen verwendet [17, 18]. Ein Expertenkomitee aus FAO und WHO kam zu dem Schluss, dass der Verzehr von Carrageen gesundheitlich unbedenklich ist. Ein Grenzwert für einen maximal akzeptablen täglichen Verzehr wurde in der neuesten Empfehlung nicht mehr festgelegt [19]. Die Verwendung von Carrageen als Hilfsstoff in der Formulierung von Arzneimitteln wurde bereits untersucht. Es wurde versucht, eine Verbesserung der

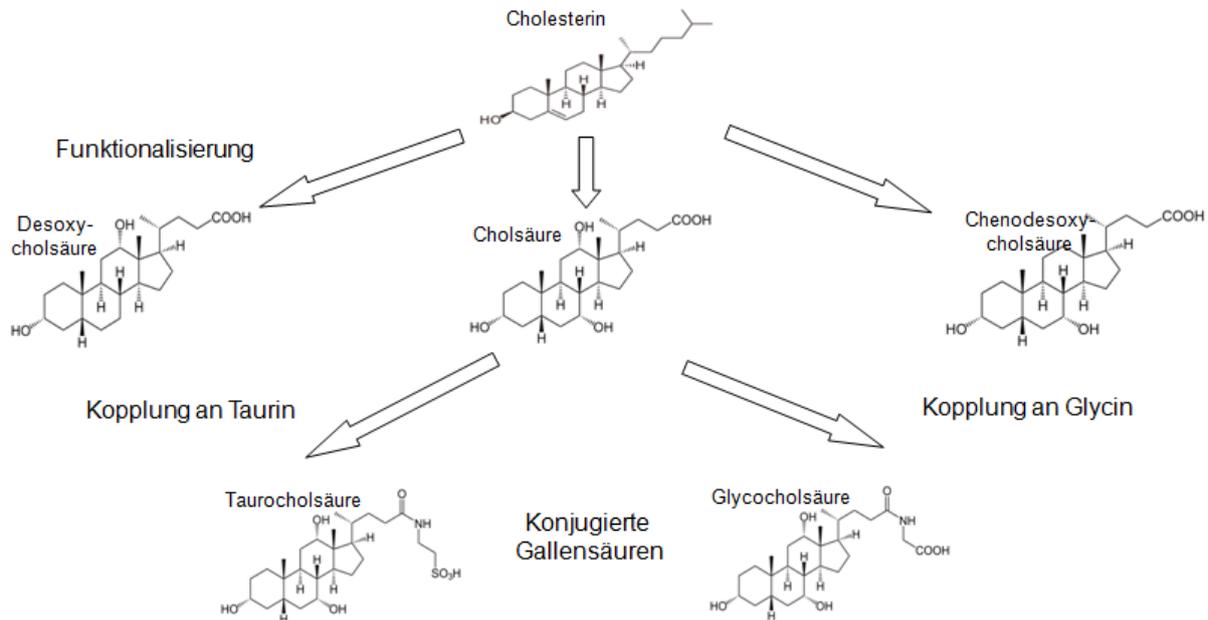
Permeabilität von nasal [20], vaginal [21] und ophtalmisch [22] verabreichten Wirkstoffen zu erreichen. Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurde die Eignung von λ -Carrageen als Permeationenhancer nach peroraler Applikation in vitro und in vivo untersucht.

Eudragit E



Bei Eudragit E handelt es sich um ein kationisches Copolymer, bestehend aus Dimethylaminoethyl-Methacrylat, Butyl-Methacrylat und Methyl-Methacrylat. Eudragit E, das amphiphile Eigenschaften besitzt, stuft die FDA als inerten Hilfsstoff ein. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte allerdings eine Verbesserung der Permeabilität von Trosipium über Caco-2-Zellmonolayer in Gegenwart von Eudragit E festgestellt werden [23]. In dieser Arbeit wird geprüft, ob Eudragit E die Permeabilität auch in intestinalen Ligated-Loop-Studien und in vivo nach peroraler Gabe bei Ratten verbessern kann.

Gallensäuren – biologische Funktion und Gebrauch als Permeationsverbesserer

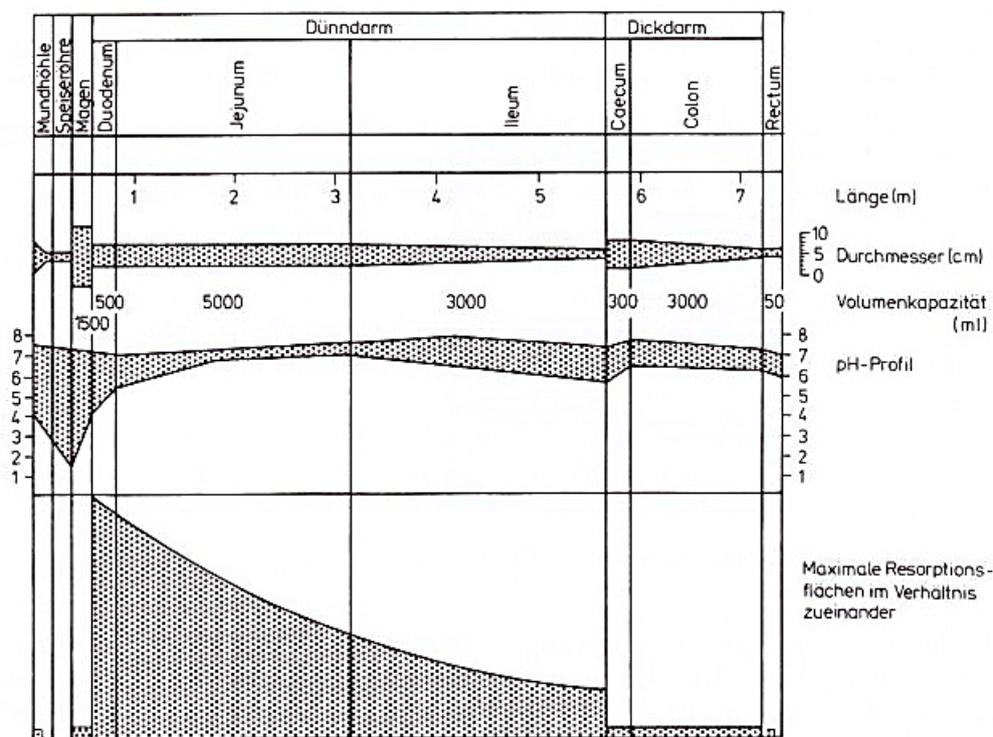


Gallensäuren werden in den Hepatozyten aus Cholesterin gebildet. Sie werden in die Gallenblase sezerniert, eingedickt und gespeichert. Nach entsprechendem Reiz, beispielsweise wenn Lipide in den Dünndarm gelangen, werden Gallensäuren ins Duodenum abgegeben. Gallensäuren spielen eine wichtige Rolle für die Fettverdauung. Sie ermöglichen das Emulgieren der Fette und somit deren Verdauung. Ein großer Teil der Gallensäuren wird im Körper an Glycin oder Taurin gekoppelt. Da sich der pH-Wert in der Galle im Alkalischen befindet, liegen sie meist in Form ihrer Natriumsalze vor. Gallensalze unterliegen dem hepatischen Kreislauf, sie werden im Dünndarm dekonjugiert und im Ileum rückresorbiert [24]. Im Nüchternzustand (fasted state) beträgt die Konzentration an Gallensalzen im Dünndarm ca. 5 mM, nach Nahrungsaufnahme (fed state) ca. 15 mM [25]. Nach Nahrungsaufnahme sind die meisten Gallensalze jedoch an Nahrungsfette gebunden. Gallensalze wurden auch schon als Permeationsverbesserer eingesetzt. Beispielsweise wurde die passive Diffusion von Oligonukleotiden durch Chenodesoxycholol im Jejunum und Ileum von Ratten erhöht [26]. In dieser Arbeit soll die Rolle, die Gallensalze bei der Aufnahme von Tropsium und insbesondere bei der verminderten Bioverfügbarkeit von Tropsium nach Nahrungsaufnahme spielen, genauer untersucht werden.

Zielsetzungen der Dissertation

- Untersuchung der Eignung von mucoadhäsiven Substanzen zur Verbesserung der gastrointestinalen Permeabilität am Beispiel von λ -Carrageen
- Untersuchung der Eignung von Eudragit E als Permeationsenhancer für Trosipium in vivo in Ratten
- Untersuchung der Wirksamkeit von Chitosan-HCl zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Aciclovir
- Untersuchung der Rolle von Gallensalzen bei der verminderten Bioverfügbarkeit von Trosipium nach Nahrungsaufnahme
- Untersuchung der Übertragbarkeit von Daten zur Permeabilität, die mittels verschiedener Modelle gewonnen wurden, kritische Begutachtung im Hinblick auf die Verwendung der Daten bei der Zulassung von Biowaivern

1.1. Resorption im Gastrointestinaltrakt



Figur 1.1. (aus Bauer Frömming Führer; Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie)

Die Mundschleimhaut verfügt über eine relativ kleine Resorptionsfläche und ist zusätzlich mit Mucin bedeckt, welches die Resorption weiter verlangsamt. Eine Resorption über die Mundschleimhaut wird nur bei Sublingual- und Buccaltabletten angestrebt, welche oft Wirkstoffe enthalten, die bereits in sehr niedrigen Dosen wirksam sind.

Der Magen spielt als Resorptionsorgan bedingt durch seine kleine Resorptionsfläche, die eine dicke Schleimschicht überzieht, eine untergeordnete Rolle. Zerfall der Arzneiform und vollständige Freisetzung des Wirkstoffes im Magen spielen jedoch, zumindest bei schnellfreisetzenden Arzneiformen, eine essenzielle Rolle. Zudem kann die Verweilzeit im Magen mit dessen Füllungszustand von 0,1–3 h variieren und zu einer verzögerten Resorption im Dünndarm führen.

Für die meisten Arzneistoffe stellt der Dünndarm das wichtigste Resorptionsorgan dar. Der Dünndarm ist unterteilt in Duodenum, Jejunum und Ileum. Die resorptive Oberfläche des

Dünndarms ist durch dessen Anatomie stark vergrößert. In der ersten Stufe entsteht die Vergrößerung durch Falten in der Schleimhaut, die sogenannten Kerckring-Falten. Auf diesen Falten befinden sich wiederum sogenannte Zotten oder Villi. Das Epithel der Zotten besteht aus Enterozyten und vereinzelt Becherzellen, die den Mukus produzieren. Die luminalen Seite der Enterozyten verfügt über Fortsätze, sogenannte Mikrovilli, die eine weitere Vergrößerung der Oberfläche bewirken. Insgesamt wird die Oberfläche des Dünndarms so um den Faktor 600 vergrößert. Es werden insgesamt Flächen von bis zu 200 m² erreicht. Das Duodenum, das sich direkt an den Magen anschließt, weist zwar nur eine Länge von 12 cm auf, es verfügt aber über die größte Resorptionsfläche pro Länge. Das sich an das Duodenum anschließende Jejunum dehnt sich über eine Länge von ca. 1,5-2 m. Das Ileum erreicht eine Länge von 2-3 m. Vom Duodenum Richtung Ileum werden die Schleimhautfalten weniger und die Anzahl der Becherzellen nimmt gleichzeitig zu, wodurch die resorptive Oberfläche in distaler Richtung immer kleiner wird. Die Verweilzeit im Dünndarm beträgt insgesamt 2-4 h.

Das Kolon erstreckt sich im Vergleich zum Dünndarm über eine wesentlich kleinere Oberfläche. Die im Kolon in großer Zahl vorhandenen Bakterien werden beim sogenannten Kolon-Targeting ausgenutzt. Hier werden Arzneiformen mit bakteriell abbaubaren Überzügen versehen [27-29]. Ob die Resorption eines Wirkstoffes aus dem Kolon möglich ist, hängt von dessen physikochemischen Eigenschaften ab. So konnte an einem Ussing-Kammer-Modell mit Rattendarm gezeigt werden, dass hydrophilere Stoffe besser über Jejunum permeieren, während lipophilere Stoffe besser über Kolon permeieren [30].

1.2. Interzelluläre Verbindungen

Bei gap junctions handelt es sich um Kontaktstellen, bei denen die Zellmembranen durch einen 3 nm großen Spalt getrennt sind. Die Zellen sind untereinander durch Tunnelproteine, sogenannte Konnexine, verbunden. Dadurch werden ein erleichterter Stofftransport und die erleichterte Übertragung von elektrischen Potentialänderungen ermöglicht.

Bei Desmosomen befinden sich Glykoproteine und Mikrofilamente im 30 nm breiten Interzellularspalt. In die im Kontaktbereich verdickten Zellmembranen der benachbarten

Zellen strahlen Zellfilamente ein. Desmosomen dienen der mechanischen Verankerung benachbarter Zellen.

Tight junctions oder Zonulae occludens sind Verschmelzungen der äußeren Schichten benachbarter Zellen. Der Interzellularraum wird an diesen Stellen unterbrochen [28]. Tight junctions stellen beim parazellulären Transport den limitierenden Faktor dar [31]. Das ist einer der Gründe, warum die Untersuchung der Struktur von tight Junctions in letzter Zeit vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt ist. Bei tight junctions handelt es sich um Komplexe aus mehreren Untereinheiten, die aus Proteinkomplexen zusammengesetzt sind, welche direkt mit dem darunterliegenden Actomyosin-Ring verbunden sind. Zu den bereits identifizierten tight junction-Proteinen gehören die transmembranösen Proteine Claudin und Occludin sowie die auf der zytoplasmatischen Seite liegenden Proteine ZO-1, ZO-2, ZO-3, Cingulin und 7H6 [32]. Neben der Regelung des parazellulären Transports dienen sie als Abgrenzung der Plasmamembran selbst und trennen die unterschiedlichen apikalen und die basolateralen Oberflächen der Zellen [33]. Weiterhin spielen sie eine Rolle bei der Signaltransduktion über Zellmembranen [34]. Tight junctions in verschiedenen Geweben unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Durchlässigkeit. Während die tight junctions an der Blut-Hirn Schranke eine sehr dichte Barriere bilden, sind sie im Dünndarm wesentlich besser passierbar [35].

1.3. Parazellulärer Transport

Generell gilt, dass hydrophile Moleküle eher parazellulär Membranen überwinden, während lipophile Moleküle dazu neigen, eine Membran transzellulär zu überwinden. Beim parazellulären Transport handelt es sich um eine passive Diffusion, die vom Konzentrationsgefälle abhängig ist und die nach dem Fickschen Diffusionsgesetz abläuft. Der parazelluläre Transport wird, wie oben beschrieben, durch tight junctions reguliert. Der Raum zwischen den einzelnen Zellen beträgt ca. 1-5 nm. Im Normalfall können Moleküle mit einem Radius, der mehr als 1,5 nm beträgt, diesen Weg nicht nutzen [36]. Das Gleiche

gilt für Substanzen mit einem Molekulargewicht größer als 180-200 Da. Grundsätzlich werden Kationen besser transportiert [35].

1.4. Transzellulärer Transport

Der transzelluläre Transport spielt insgesamt eine größere Rolle als der parazelluläre Transport. Man unterscheidet verschiedene Mechanismen des transzellulären Transports.

1.4.1. Passiver Transport

Auch bei der passiven transzellulären Diffusion stellt der Konzentrationsgradient die treibende Kraft dar. Demnach folgt auch hier die Diffusion dem Fickschen Diffusionsgesetz. Dabei gilt, dass vor allem lipophile, kleine und ungeladene Moleküle die Lipiddoppelschicht auf diesem Weg überwinden können.

Eine Sonderform des passiven Transportes ist der Transport durch Kanalproteine. Diese haben in der Regel eine hohe Substratspezifität und sind nicht immer geöffnet. Die wassergefüllten Kanalproteine haben einen Durchmesser von unter 1 nm. Es werden vor allem Ionen und Wasser (Aquaporine) durch Kanalproteine transportiert.

Als weitere Sonderform des passiven Transports zeigen sich Carrier-vermittelte Transportprozesse. Carrier sind häufig in der Lage, mehrere Teilchen in einem festen stöchiometrischen Verhältnis zu transportieren. Man unterscheidet Symporter, die mehrere Teilchen in die gleiche Richtung transportieren, und Antiporter, die Teilchen in die jeweils entgegengesetzte Richtung transportieren.

1.4.2. Aktiver Transport

Sogenannte Pumpen stellen eine Art des aktiven Transports dar. Dabei wird Energie verbraucht. Die Energie wird in der Regel durch die Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat gewonnen. Auf diese Weise ist auch der Transport einer Substanz entgegen ihres Konzentrationsgradienten, bzw. bei polaren Substanzen entgegen des elektrischen Gradienten möglich. Der wichtigste Vertreter ist die Na^+/K^+ -ATPase.

Eine weitere Art des aktiven Transports stellt der sekundär aktive Transport dar. Dabei handelt es sich um einen passiven Carrier-vermittelten Transport, der durch einen aktiven Transport angetrieben wird. Man unterscheidet weiterhin tertiär aktive Transporte. Dabei wird ein passiver Carrier-vermittelter Transport durch einen sekundär aktiven Transport angetrieben.

1.4.3. Zytotische Prozesse

Beim Transport von Makromolekülen werden diese in Membranvesikel eingeschnürt. Je nach Transportrichtung unterscheidet man Endozytose und Exozytose. Die unspezifische Aufnahme von Flüssigkeit und evtl. darin gelöster Stoffe bezeichnet man als Pinozytose. Zytotische Prozesse spielen für den Transport von Arzneistoffen eine untergeordnete Rolle [27, 28].

1.5. Einflüsse von Hilfsstoffen

1.5.1. Überblick

Tabelle 1.1 soll einen Überblick über die verschiedenen Einflüsse von Hilfsstoffen auf die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen geben. Dabei wird unterschieden zwischen Einflüssen auf die intestinale Transitzeit, Einflüssen durch Modulation von tight junctions und Einflüssen,

die durch luminale Reaktionen zustande kommen. Einflüsse auf tight junctions sind dabei die einzigen, die in den meisten Fällen beabsichtigt sind und gezielt zu einer besseren Aufnahme von schlecht permeablen Substanzen führen sollen. Eine durch Hilfsstoffe bedingte Verkürzung der intestinalen Transitzeit führt hingegen zu einer geringeren Wirkstoffabsorption, genau wie die meisten der beobachteten luminalen Reaktionen.

Veränderung der intestinalen Transitzeit					
Hilfsstoff	Konzentration	Wirkstoff	Modell	Effekt	Quelle
Dinatriumdihydrogenphosphat	1132 mg peroral	Ranitidin	Mensch	6	[37, 38]
Xylitol	30 g	(^{99m} Tc-Sn) colloid	Mensch	7	[39]
Mannitol	2,264 g	Cimetidin	Mensch	1	[40]
Lactulose	20 ml	Sulfasalazin	Mensch	7	[41]
Sorbitol	5 g	Ranitidin, Metoprolol	Mensch	1	[42]
Sorbitol	10 g	(Darminhalt)	Mensch	7	[43]
Sorbitol	10 g	Theophyllin	Mensch	7	[44]
Ölsäure	1200 mg	(Tabletten)	Mensch	8	[45]
PEG 400	10 g	Ranitidin	Mensch	1,7	[46]
PEG 400	10 g	Transport wirkstofffreier Pellets	Mensch	7	[47]
Interaktionen mit der Membran					
Hilfsstoff	Konzentration	Wirkstoff	Modell	Effekt	Quelle
EDTA	1 mM	PEG 4000	Caco-2	3	[48]
EDTA	0,5 mg/kg	Heparin	Ratte / Hund	3	[49]
EDTA	30 mM	Salicylsäure	Ratte intrajej.	2	[50]
EDTA	1%	Fosfomycin	Ratte intrajej.	2	[51]
EDTA	1 mM	Iron	Caco-2	9	[52]
EGTA	2,5 mM	Clodronat	Caco-2	3	[53]
SDS	1%	Insulin	Ratte nasal	2	[54]
SDS	1%	Propranolol u.a.	Orale Mukosa Hund	3	[55]
DOSS	500 mg	Phenolsulfonphtalein	Mensch	2	[56]
TPGS	2,5%	Berberin	Ratte po	2	[57]
Natriumhexanoat	2,0 M	Cefoxitin	Ratte in vivo	2	[58]
Natriumhexanoat	30 mg/kg	LMWH	Ratte Jejunum	2	[59]
Natriumoctanoat	0,25%	Mannitol, PEG 900 u.a.	Ratte Kolon UK	3	[60]
Natriumoctanoat	0,69 M	Cefoxitin	Ratte in vivo	2	[58]
Natriumoctanoat	0,25%	Mannitol	Caco-2	3	[61]

Einleitung und Zielsetzung der Dissertation

Natriumoctanoat	30 mg/kg	LMWH	Ratte Jejunum	2	[59]
Natriumdecanoat	0,25%	Mannitol	Caco-2	3	[61]
Natriumdecanoat	0,22 M	Cefoxitin	Ratte in vivo	2	[58]
Natriumdecanoat	0,25%	Mannitol, PEG 900 u.a.	Ratte Kolon UK	3	[60]
Natriumdecanoat	13-50 mM	Mannitol, PEG 900	Caco-2	3	[62]
Natriumdecanoat	0,05-0,5mmol/kg	Modell-Decapeptid	Ratte in vivo	2	[62]
Natriumdecanoat	25-100 mg/kg	ISIS 2503 & 104838	Schwein in vivo	2	[63]
Natriumdecanoat	10 mM	Fluorescein, FITC-dextran	HT-29/B6- Zellen	3	[64]
Natriumdecanoat	0,25%	Cefmetazol	Ratten	3	[65]
Natriumdecanoat	25 mg	Ampicillin	Mensch	2	[66]
Natriumdecanoat	660 mg	Antisense Oligonukleotid	Mensch	2	[67]
Natriumdecanoat	GIPET®-Formulierung	Acylin	Mensch	2	[68]
Natriumdecanoat	30 mg/kg	LMWH	Ratte Jejunum	2	[59]
Natriumdodecanoat	0,25%	Mannitol	Caco-2	3	[61]
Natriumdodecanoat	30 mg/kg	LMWH	Ratte Jejunum	2	[59]
Natriumtetradecanoat	30 mg/kg	LMWH	Ratte Jejunum	2	[59]
MCGs	7 mM	LMWH	Kaninchen rektal	2	[69]
MCGs	1%	Mannitol	Kaninchen Dünndarm	3	[70]
Palmitoylcarnitin	0-1 mM	Mannitol, PEG 4000	Caco-2, IEC-18	3	[71]
Palmitoylcarnitin	0,2 mM	Clodronat	Caco-2	3	[53]
Palmitoylcarnitin	24 mg Ratte 600 mg Hund	Cefoxitin	Hunde, Ratten	2	[72]
Lauroylcarnitin	0,1%	Calcitonin	Ratte nasal	9	[73]
Lauroylcarnitin	40 mg/kg	DMP 728	Hunde po	2	[74]
Chitosan	Nanopartikel versch Konz	Insulin	Ratte	2	[75]
Chitosan	0,06255%	Oxaprozol	Caco-2	3	[76]
Chitosan	0,2% / 0,5%	Insulin	Ratte / Schaf nasal	9	[77]
Chitosan	0,25%	Insulin	Ratte nasal	2	[78]
Chitosan	0,1%-0,5%	Mannitol	Caco-2	3	[79]
Chitosan-HCl	1,5%	Buserelin	Ratte intrajejunal	9	[80]
Chitosan-HCl	1,5%	Mannitol	Caco-2	3	[81]
Chitosanglutamat	1,5%	Mannitol	Caco-2	3	[81]
N-sulfonato-N,O-Carboxymethylchitosan	3%	LMWH	Caco-2	3	[82]
Monocarboxymethylchitosan	3%	LMWH	Caco-2, Ratte intraduodenal	9	[83]
Trimethylchitosan	1%	Octreotid	Intraduodenal Schwein	2	[84]
Trimethylchitosan	1,5%	Buserelin	Caco-2	3	[85]
Trimethylchitosan	0,25%	Mannitol	Caco-2	3	[86]

Trimethylchitosan	Nanopartikel	Insulin	Ratte, Caco-2	3	[87]
Trimethylchitosan	1,5%	Buserelin, Mannitol	Caco-2	3	[88]
Trimethylchitosan	1%	Buserelin	Ratte intraduodenal	3	[89]
Chitosancystein	0,5%	Bacitracin-FITC	Meerschweinchen Dünndarm	3	[90]
TMC-Cystein	Nanopartikel-Formulierungen	Insulin	Caco-2 Ratte peroral / intraduod.	3	[91]
TMC-Cystein					
N-Succinyl-Chitosan	0,1%	ISDN	Ratte intranasal	9	[92]
Natriumlaurylsulfat	1%	Cefadroxil	Duodenum Ratte in situ	9	[93]
Tetradecylmaltosid	0,125%	Enoxaparin	Ratte in vivo	2	[94]
Tetradecylmaltosid	0,0625%	Enoxaparin	C2BBel	3	[94]
Octylglucosid	0,3%	Mannitol, Lucifergelb	T-84, Caco-2	3	[95]
Na-chenodesoxycholat	2,4 mM	ON3, ON6 (Oligonukleotide)	Jejunum & Ileum Ratte	9	[96]
Na-Cholat	5 mM	Meerrettichperoxidase	Ratte intrajej	9	[97]
Na-Cholat	2-20 mg	Insulin	Ratte Kolon	2	[98]
Na-Desoxycholat	1-10 mg	Insulin	Ratte Kolon	2	[98]
Na-Desoxycholat	1%	Cefotaxim, Ceftazidim	Ratte Jejunum	3	[99]
Na-taurocholat	5 mM	Meerrettichperoxidase	Ratte intrajej	9	[97]
Na-Taurocholat mizellar	Liposomale Formulierungen	Insulin	Caco-2	3	[100]
Na-Taurocholat mizellar	Mizellare Formulierungen	Heparin	Ratte Kolon	2	[101]
Na-Desoxytaurocholat	10 mM	Salicylat	Ratte Jejunum	3	[102]
C12/POE-9	0,5%	Insulin	Kaninchen rektal	2	[103]
C12/POE-10	0,1%	Paraquat	Kaninchen Magenmukosa	3	[104]
Labrasol	10%	Ganciclovir	Ratte Jejunum	3	[105]
Thiol. Polycarbophil / Gluthation	1% / 0,5%	Fluorescein / FITC-Dextran	Ratte	2	[106]
Eudragit E	30 µg/mL	Trospium, Mannitol	Caco-2	3	[107]
Carbopol	Emulsionsformulierung	Calcitonin	Ratte Kolon	2	[108]
Zonula-occludens-Toxin	4 µg/mL	Sucrose, Inulin, Doxorubicin, Paclitaxel	BBMEC-Zellen	3	[109]
AT-1002 (+ mucoadhäsive Subst)	5 mg/kg	Inulin, Calcitonin, Saquinavir	Ratten intranasal+	3	[110]

Luminale Reaktionen

Hilfsstoff	Konzentration	Wirkstoff	Modell	Effekt	Quelle
Natriumhydrogencarbonat	100 mg	Ibuprofen	Mensch	4	[111]
Natriumhydrogencarbonat	200 mg	Erythromycinacistrat	Mensch	2	[112]
PEG 4000	Komplex mit WS	Phenobarbital	Isolierter Dünndarm Ratte	10	[113]
Calciumsulfat	Komplex mit WS	Phenytoin	Mensch	10	[114, 115]
Polysorbat 80	Komplex mit WS	Chlorpromazin	Polysiloxan Membran	10	[116]
Natriumlaurylsulfat	Komplex mit WS	Chlorpromazin	Polysiloxan	10	[116]

			Membran		
Magnesiumcarbonat	Komplex mit WS	Tetracyclin	Mensch	1	[117, 118]
Lactose	Maillard Rkt mit WS	Acyclovir	In-vitro-Kompatibilitäts-Studie	11	[119]
Lactose	Maillard Rkt mit WS	Amlodipin	In-vitro-Kompatibilitäts-Studie	11	[1]
Lactose	Maillard Rkt mit WS	Metformin	In-vitro-Kompatibilitäts-Studie	11	[120]
Polyvinylpyrrolidon	Reaktion mit WS	Oxprenolol	In-vitro-Kompatibilitäts-Studie	11	[121]
Polyvinylpyrrolidon	Reaktion mit WS	Sulfathiazol	In-vitro-Kompatibilitäts-Studie	11	[122]
Magnesiumstearat	Reaktion mit WS	β -Lapachon	In-vitro-Kompatibilitäts-Studie	11	[123]
Croscarmellose	Reaktion mit WS	Atenolol, Verapamil etc.	In-vitro-Kompatibilitäts-Studie	11	[124]
Crospovidon	Reaktion mit WS	Atenolol, Verapamil etc.	In-vitro-Kompatibilitäts-Studie	11	[124]
Papain	1:1	LMWH	Ratten po	2	[125]
SNAC (Natrium-N-(8-(2-hydroxybenzoyl)amino)caprylat)	150 mg/kg	Heparin	Affen po	2	[126]
SNAC	10,5 g	Heparin	Mensch po	2	[127]
SNAC	10,5 g	Heparin	Mensch po	2	[128]

Tabelle 1.1 Verschiedene Einflüsse durch Hilfsstoffe

Effekte: 1) Verringerte Bioverfügbarkeit; 2) Erhöhte Bioverfügbarkeit; 3) Erhöhte Permeabilität; 4) Schnellere Absorption; 5) Bildung unlöslicher Komplexe; 6) Verringerte Absorption; 7) Verkürzte intestinale Transit Zeit; 8) Verlängerte intestinale Transit Zeit; 9) Erhöhte Absorption; 10) Verringerte Permeabilität; 11) Reaktion mit Wirkstoff

Nicht alle Hilfsstoffeinflüsse, die in der Tabelle aufgelistet sind, werden im Folgenden ausführlich diskutiert. Es soll vielmehr ein Überblick anhand aufschlussreicher, ausgesuchter Beispiele gegeben werden. Dabei wird auch der genaue Mechanismus, durch den die Substanzen ihren Einfluss ausüben, in einigen Fällen erklärt. Ein besonderer Fokus ist dabei auf die gezielte Beeinflussung von tight junctions gerichtet.

1.5.2. Veränderung der intestinalen Transitzeit

Im Folgenden soll ein Überblick über Hilfsstoffe gegeben werden, die durch Modulation der intestinalen Transitzeit Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen ausüben. Bei den beschriebenen Effekten handelt es sich in den meisten Fällen um unbeabsichtigte Beeinflussungen. Es ist besonders für die Zulassung von Biowaivern unerlässlich, solche Effekte vorhersagen zu können und gegebenenfalls auf die Verwendung der entsprechenden Hilfsstoffe zu verzichten. Ölsäure oder andere lipophile Substanzen könnten evtl. gezielt zur Verlängerung der Dünndarmpassagezeit genutzt werden, um die Bioverfügbarkeit von Substanzen der BCS Klassen 3 und 4 zu erhöhen.

Dinatriumhydrogenphosphat

Bei der Entwicklung einer Ranitidin-Brauselösung wurde festgestellt, dass sich aufgrund von Interaktionen mit dem Wirkstoff nur wenige Substanzen als Säurekomponente eignen. Mit dem Hilfsstoff Dinatriumhydrogenphosphat wurden zunächst keinerlei Interaktionen festgestellt. Es wurde nach Verabreichen der Brausetabletten eine im Vergleich zu herkömmlichen Ranitidin-Tabletten gleiche oder erhöhte Bioverfügbarkeit erwartet. Vorversuche ergaben jedoch, dass die Ranitidin- Bioverfügbarkeit im Vergleich zu den Tabletten nur ca. 50% betrug.

Daher wurde 1993 zunächst eine Crossover-Studie durchgeführt, bei der 12 Probanden eine Lösung von 150 mg Ranitidin mit und ohne Zusatz von 1132 mg Dinatriumhydrogenphosphat erhielten. Die Probanden erhielten an weiteren Versuchstagen die Formulierung der Brauselösung mit und ohne 1132 mg Dinatriumhydrogenphosphat. Es wurde festgestellt, dass die Bioverfügbarkeit durch Zusatz von Dinatriumhydrogenphosphat nach Verabreichung von Pulver und Brauselösung auf 53-54% des ohne Dinatriumhydrogenphosphat erreichten Wertes zurückging.

In einer weiteren Crossover-Studie wurde wiederum 12 Probanden 200 ml Wasser, das 50 μCi $^{111}\text{InCl}$ enthielt mit und ohne Zusatz von 1132 mg Dinatriumhydrogenphosphat

verabreicht. Der Zusatz von Dinatriumhydrogenphosphat zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Zeit der Magenentleerung, jedoch wurde die Zeit der Dünndarmpassage auf durchschnittlich 56% der Zeit ohne den Hilfsstoff gesenkt. Der Rückgang lässt sich sehr gut mit dem Rückgang der Bioverfügbarkeit korrelieren. Eine mögliche Erklärung liefert die Wirkung von Dinatriumhydrogenphosphat als salinisches Abführmittel, das Wasser im Darmlumen zurückhält und so indirekt zu einer Stimulierung der Peristaltik führt [129].

Diese Ergebnisse bestätigte prinzipiell eine weitere Studie aus dem Jahr 1995. 8 männlichen Probanden wurden 200 ml radioaktiv markiertes Wasser mit oder ohne Zusatz von Dinatriumhydrogenphosphat gegeben. Die Probanden erhielten an jedem Versuchstag außerdem 5 nicht zerfallende Tabletten mit einem Radius von 6 mm. Abermals führte der Zusatz von Dinatriumhydrogenphosphat zu keiner signifikanten Änderung der Magenentleerungszeit. Die Zeit der Dünndarmpassage reduzierte sich durch den Hilfsstoff jedoch um 39%. Überraschenderweise hatte der Zusatz von Dinatriumhydrogenphosphat keinen Einfluss auf die Zeit der Dünndarmpassage der verabreichten Tabletten. Dies wurde damit erklärt, dass die Tabletten den Magen verzögert verlassen haben und die Wirkung des Hilfsstoffes somit bei der Dünndarmpassage der Tabletten schon vorüber war [37].

Mannitol

Adkin und andere untersuchten 1994, ob Mannitol zu einer Veränderung der Dünndarmpassagezeit führt und ob eine solche Änderung konzentrationsabhängig ist. In der Crossover Studie erhielten 8 männliche Probanden 200 ml radioaktiv markiertes Wasser mit und ohne Zusatz von Mannitol. Das Mannitol wurde ihnen an mehreren Versuchstagen in unterschiedlicher Konzentration verabreicht. Keine der Konzentrationen führte zu einer Veränderung der Magenentleerungszeit. Es kam jedoch konzentrationsabhängig zu Verkürzungen der Dünndarmpassagezeit. Dabei führten 0,755 g / 200 ml Mannitol zu einer mittleren Verkürzung um 11%, 1,509 g / 200 ml zu einer mittleren Verkürzung von 23% und 2,264 g / 200 ml zu einer mittleren Verkürzung von 34% im Vergleich zur Kontrolle. Dahinter wurde eine Wirkung von Mannitol als osmotisch wirksames Laxans vermutet. Da Mannitol wie andere Zuckeralkohole schlecht aus dem Dünndarm resorbiert wird, führt es bei

der Isotonisierung des Darminhaltes zu einem Einstrom von Wasser, der die Peristaltik stimuliert und zu vermehrten Propulsivbewegungen führt [7].

Die Ergebnisse der Studie wurden in einer weiteren Studie 1995 bestätigt. Erneut wurde 8 männlichen Probanden 200 ml radioaktiv markiertes Wasser verabreicht. Der Zusatz von 2,264 g / 200 ml Mannitol führte zu keiner Veränderung der Magenentleerungszeit, die Dünndarmpassagezeit verkürzte sich jedoch um 34%. Mannitol hatte jedoch keinen Einfluss auf die Dünndarmpassagezeit einer gleichzeitig verabreichten nicht zerfallenden Tablette mit einem Durchmesser von 6mm. Dies wurde mit einer verzögerten Abgabe der Tablette aus dem Magen begründet.

Sorbitol

In einer neueren Studie aus dem Jahr 2006 sollte festgestellt werden, ob die gleichzeitige Gabe von Sorbitol Einfluss auf die Bioverfügbarkeiten von Ranitidin, bzw. Metoprolol hat. Als Referenzsubstanz ohne Einfluss auf die Bioverfügbarkeit diente Sucrose. Im ersten Teil der Studie erhielten 20 Probanden eine wässrige Lösung mit 150 mg Ranitidin oder 50 mg Metoprolol, der jeweils entweder 5 g Sucrose oder 5 g Sorbitol zugesetzt waren. Der Zusatz von Sorbitol führte im Fall von Ranitidin zu einer signifikanten Abnahme von C_{\max} um 50% und einer Abnahme der $AUC_{(0-\infty)}$ um 45%. Im Fall von Metoprolol führte Sorbitol zu keiner signifikanten Veränderung der $AUC_{(0-\infty)}$, C_{\max} nahm jedoch um 23% ab.

Im zweiten Teil der Studie sollte der Schwellenwert für die wirksame Konzentration an Sorbitol ermittelt werden. In einer Crossover-Studie wurde 24 Probanden eine wässrige Lösung von Ranitidin verabreicht, die entweder 0; 1,25; 2,5 oder 5 g Sorbitol enthielt. Die $AUC_{(0-\infty)}$ von Ranitidin nahm nach Zugabe von 1,25 g Sorbitol um 7,2% ab, 2,5 g führten zu einer Abnahme um 25% und die Zugabe von 5 g bewirkte eine Abnahme um 45,5% [42].

Die Wirkung des Sorbitols wurde durch eine verkürzte Intestinale Transitzeit erklärt. Ähnlich wie Mannitol wirkt auch Sorbitol in hohen Dosen als osmotisches Laxans, vermehrt also das Flüssigkeitsvolumen im Darmlumen [130, 131]. Eine Verringerung der intestinalen Transitzeit nach Einnahme geringer Mengen wurde ebenfalls bereits beobachtet [43]. Die

geringere Wirkung auf die Bioverfügbarkeit von Metoprolol im Vergleich zu Ranitidin wurde mit der insgesamt besseren Permeabilität von Metoprolol begründet [132]. In einer anderen Studie führten 10 g Sorbitol nur zu einer minimalen Änderung der Bioverfügbarkeit von Theophyllin, das ebenfalls hoch permeabel ist [44]. Insgesamt lässt sich daraus also ableiten, dass BCS Klasse 1 Substanzen weniger sensitiv auf eine verkürzte intestinale Transitzeit reagieren als BCS Klasse 3 Substanzen.

Polyethylenglycol 400

In einer Crossover Studie wurde 10 Probanden 150 ml Orangensaft mit und ohne 10 g PEG 400 verabreicht. Dazu erhielten die Probanden eine Hartkapsel mit nicht zerfallenden Pellets der Größe 1,4-1,7 mm. Die Lösungen wurden mit ^{111}In radioaktiv markiert, die Pellets mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Der Zusatz von PEG 400 führte bei den Lösungen zu einer Abnahme der Dünndarmpassagezeit von 236 auf 153 Minuten. Das entspricht einer Abnahme um 35%. PEG 400 führte jedoch zu keiner signifikanten Änderung der Dünndarmpassagezeit der Pellets [47].

In einer weiteren Studie sollte überprüft werden, ob PEG 400 die gastrointestinale Aufnahme von Ranitidin beeinflusst. 10 Probanden wurde in einer Crossover-Studie eine Hartkapsel mit 150 mg Ranitidin in Form schnell freisetzender Pellets verabreicht. Dazu erhielten die Probanden 150 ml mit ^{111}In radioaktiv markierten Orangensaft mit und ohne 10 g PEG 400. Der Zusatz von PEG 400 führte zu einer signifikanten Abnahme der Dünndarmpassagezeit um 37% sowie zu einer signifikanten Minderung der Bioverfügbarkeit von Ranitidin um 31% [46].

In beiden Studien wurde der Mechanismus durch die Wirkung des PEG 400 als osmotisches Laxans erklärt. PEG 400 wird schlecht aus dem Darm resorbiert. Im Zuge der Isotonisierung stellt sich ein Einstrom von Wasser ins Darmlumen ein, der zu einer vermehrten Peristaltik und somit zu einer verkürzten Dünndarmpassagezeit führt.

Ölsäure

Bei der sogenannten Ileumbremse handelt es sich um einen physiologischen Mechanismus, der die Bewegung des Dünndarms bremst, sobald Fette ins Ileum gelangen. Dadurch soll der Einstrom weiterer Fette, die eigentlich primär in den ersten Dünndarmabschnitten verdaut werden sollten, ins Ileum verhindert werden [133].

In einer Studie sollte die Wirkung von Ölsäure auf die Dünndarmpassagezeit von Tabletten getestet werden. 8 Studienteilnehmern wurde in einer Crossover-Studie entweder 0, 300, 600 oder 1200 mg Ölsäure in einer Kapsel, die erst im Ileum freisetzen sollte, verabreicht. Die Probanden mussten zu den Kapseln nicht zerfallende Tabletten mit einem Durchmesser von 6 mm einnehmen, die mit ^{111}In radioaktiv markiert waren. Eine Stunde später mussten sie weitere Tabletten einnehmen, welche mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markiert waren. 1200 mg Ölsäure führten zu einer signifikanten Verlängerung der Dünndarmpassage der mit ^{111}In radioaktiv markierten Tabletten. Die Dünndarmpassagezeit war auch nach Einnahme von 300 und 600 mg Ölsäure bei einigen Probanden verlängert. Auch die Dünndarmpassagezeiten der Kapseln, die erst eine Stunde später eingenommen wurden, waren bei einigen Teilnehmern deutlich verlängert. Die Begründung dafür, dass diese Effekte nicht bei allen Probanden auftraten, verweist weniger auf die Unwirksamkeit niedrigerer Dosen als auf eine mögliche Freisetzung der Ölsäure-Kapseln vor Erreichen des Ileums.

Ein Effekt, wie er in dieser Studie beschrieben wird, könnte möglicherweise gezielt zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit schlecht permeabler Substanzen eingesetzt werden [45].

Andere Hilfsstoffe

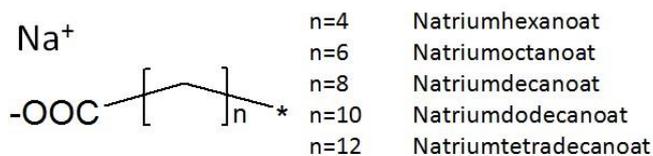
Die Einnahme von 30 g Xylitol führte in einer Crossover-Studie mit 5 Teilnehmern zu einer im Vergleich zu Glucose signifikanten Verlängerung der Magenentleerungszeit. Gleichzeitig verkürzte sich die Zeit der Dünndarmpassage nach Einnahme von Xylitol. Als Mechanismus wurde, ähnlich wie oben für Sorbitol und Mannitol beschrieben, die Wirkung von Xylitol als osmotisches Laxans vermutet [39].

Auch nach der Einnahme des Zuckeralkohols Lactulose wurde eine verkürzte Dünndarmpassagezeit beschrieben. Lactulose veränderte allerdings nicht die Magenentleerungszeit oder die Zeit für die komplette Darmpassage [41, 134].

1.5.3. Einfluss durch Interaktionen mit der Membran

Im Folgenden soll ein Überblick über Hilfsstoffe gegeben werden, die durch Interaktionen mit der Membran des Dünndarmes oder des Kolons zu einer verbesserten Permeation eines Wirkstoffes führen. Bei den meisten Interaktionen handelt es sich um die gezielte Modulation von Membranen mit dem Ziel, die orale Bioverfügbarkeit von BCS Klasse III und IV Substanzen zu verbessern. Meist soll dies über die Öffnung von tight junctions über verschiedene Mechanismen erreicht werden. In einigen Fällen wird die Membran durch Herauslösen von Proteinen und/oder Phospholipiden permeabler gemacht. Ein weiterer Ansatz zielt auf das Erreichen einer verlängerten Kontaktzeit mit der Membran durch Bindung des Wirkstoffes an eine mukoadhäsive Substanz ab.

Mittelkettige Fettsäuren



Es gab viele Versuche, bei denen mit Hilfe mittelkettiger Fettsäuren verschiedener Länge versucht wurde, die Permeabilität vor allem hydrophiler Substanzen aus dem Gastrointestinaltrakt zu verbessern.

Bereits 1988 wurde eine Studie veröffentlicht, in welcher die Wirksamkeiten von Natriumhexanoat (C6), Natriumoctanoat (C8), Natriumdecanoat (C10) und Natriumdodecanoat (C12) als Resorptionsverbesserer für Natrium-Cefotixin nach rektaler Gabe in Wistar-Ratten verglichen wurden. Dabei wurde gezeigt, dass die Absorption von

Cefotixin durch Zugabe von C6, C8 und C10 signifikant erhöht werden konnte. Die minimale Fettsäure-Dosis, die für eine signifikante Wirkung benötigt wurde, war dabei für C10 am niedrigsten (0,22M), gefolgt von C8 (0,69M) und C6 (2M). Mit C12 konnte aufgrund dessen geringerer Löslichkeit in wässrigem Medium (maximal 0,03M) keine signifikante Wirkung erzielt werden. Die maximal erreichbare Absorptionsverbesserung war nach Zugabe von C8 und C10 in etwa gleich, während sich durch Zugabe von 2M C6 eine komplette Absorption des Wirkstoffes einstellte. Dieser Effekt wurde jedoch auch durch die hohe Ionenstärke begründet, welche grundsätzlich zu einer höheren Wirksamkeit der Fettsäuren führt. Wenn die Konzentration der Fettsäure die CMC überschritt, war bei allen geprüften Fettsäuren keine weitere Erhöhung des Effektes mehr möglich [58].

In einer Studie aus dem Jahr 1991 wurde der permeabilitätserhöhende Effekt von C8 und C10 für 7 wasserlösliche Substanzen (Inulin, PEG 900, Mannitol, Erythritol, Glycerol, Harnstoff und Thioharnstoff) über isoliertes Rattenkolon in der Ussing-Kammer verglichen. Die Permeabilität aller Substanzen konnte durch Zugabe der Fettsäuren verbessert werden. C10 zeigte dabei insgesamt eine höhere Wirksamkeit. Die Autoren folgerten, dass der Wirkmechanismus beider Fettsäuren unterschiedlich ist und dass beide eine Permeabilitätserhöhung sowohl auf dem parazellulären als auch auf dem transzellulären Weg bewirken [60].

Lindmark und andere haben 1995 eine Studie veröffentlicht, bei der die Wirksamkeit von C6, C8, C10 und C12 als Absorptionsverbesserer für Mannitol über Caco2-Monolayer getestet wurde. Nur C8, C10 und C12 zeigten dabei eine Wirkung, während C6 die Absorption von Mannitol nicht verbesserte. C8 wirkte nur, wenn der Puffer eine erhöhte Tonizität hatte. C10 bewirkte Veränderungen im Cytoskelett, während C12 keinen Effekt auf die Struktur des Cytoskeletts hatte [61].

In einer weiteren Studie wurde versucht durch Zugabe von Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge (C6-C14) die intestinale Absorption von Heparin mit niedrigem Molekulargewicht (LMWH) zu ermöglichen, welches alleine verabreicht keine nennenswerte Absorption zeigt. Ratten wurden 20 mg/kg LMWH und 30 mg/kg der jeweiligen Fettsäure

intraduodenal verabreicht. Dabei zeigten alle Fettsäuren eine Wirkung. Die größte Wirksamkeit hatten C10 und C12 [59].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die unterschiedlichen Fettsäuren auf unterschiedliche Art und Weise ihre Wirkung entfalten. In den verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass C10 unter den untersuchten Fettsäuren das größte Potential besitzt. Daher beschäftigten sich spätere Studien vor allem mit der Wirkung von C10.

Natriumdecanoat

Nach einer 1999 veröffentlichten Studie verbesserte C10 in Konzentrationen von 13-50 mM den Transport von Mannitol und PEG 900, die primär parazellulär transportiert werden, dosisabhängig. Im Gegensatz dazu erreichte C10 in einer Konzentration von 20-25 mM den maximalen Effekt auf die Verbesserung des Transports eines Modelldekapeptides. Dies wurde auf eine mögliche Komplexierung von C10 und Dekapeptid zurück geführt. Der TEER-Wert, der nach Gabe von 13-25 mM C10 um 40-65% zurückging, erholte sich nach Entfernung des C10 teilweise wieder. In der gleichen Studie konnte die Bioverfügbarkeit des Dekapeptides nach Gabe in Rattenileum durch C10 in Mengen von 0,05-0,5 mmol/kg signifikant erhöht werden. Bei der folgenden histologischen Untersuchung des Darmgewebes konnten keinerlei Schäden an der Mucosa festgestellt werden [62].

Im Rahmen einer weiteren Studie wurden 8 Schweinen intrainestinal 2 Antisense-Oligonukleotide (AO) verabreicht. Beide Substanzen zeigten nach Verabreichung ohne Enhancer keine detektierbaren Plasmaspiegel. Nach Verabreichung mit 25-100 mg/kg C10 konnte die Bioverfügbarkeit signifikant verbessert werden. Dabei wurde im Vergleich zu 25 mg/kg durch höhere Konzentrationen keine weitere Verbesserung der Bioverfügbarkeit erreicht. Alle gegebenen Dosen an C10 wurden gut toleriert und führten zu keinerlei histologischen Veränderungen bei den Schweinen [63].

Die Wirkung von C10 wurde auch schon in Studien an Menschen untersucht. In der ersten Studie, die 1997 durchgeführt wurde, nahmen 8 Probanden Ampicillin-Suppositorien mit und ohne C10 ein. Durch Zugabe von C10 konnten die AUC im Mittel um das 2,3-fache und C_{\max}

im Mittel um das 2,6-fache erhöht werden. Nach dieser Studie konnte ein reversibler Schaden an der Mukosa detektiert werden. In einigen Ländern sind mittlerweile C10-haltige Ampicillin-Suppositorien im Handel [66, 135].

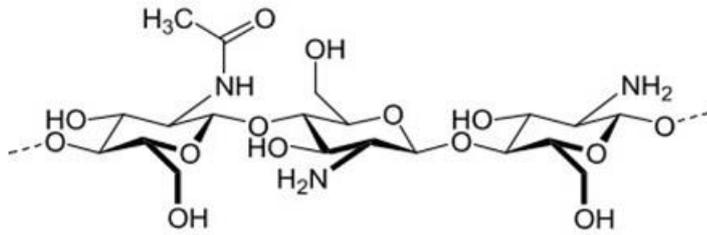
Im Rahmen der zweiten Humanstudie wurden 15 Probanden eine magensaftresistente Kapseln mit teilweise pulsatiler Freisetzung, die ein Antisense-Oligonukleotid enthielten, verabreicht, welches alleine keine nachweisbare Bioverfügbarkeit zeigt. Durch Zugabe von C10 konnte im Schnitt eine 9,5%ige Bioverfügbarkeit erreicht werden. Da das Oligonukleotid einer starken Verteilung ins Gewebe unterliegt, ist es wahrscheinlich, dass die Plasma-Bioverfügbarkeit von 9,5% nicht die wahre Bioverfügbarkeit im Gewebe widerspiegelt [67].

In einer 2009 veröffentlichten Human Crossover-Studie wurde 8 Probanden Acylin, ein GnRH Antagonist, peroral verabreicht. Dabei wurden 10, 20 oder 40 mg mit GIPET[®] verarbeitetes Acylin gegeben. Bei GIPET[®] handelt es sich um ein System, dessen permeabilitätsverbessernde Wirkung auf der Verwendung von C10 beruht. Acylin ist, wenn es alleine peroral verabreicht wird, nicht bioverfügbar. In der Studie konnte nach allen 3 Dosen eine systemische Wirkung des Acylins anhand gesenkter Serumspiegel an LH, FSH und Testosteron gezeigt werden [136, 137].

Der genaue Wirkmechanismus von C10 wurde in verschiedenen Studien untersucht. Dabei wurden ein parazellulärer Mechanismus, welcher die Hauptwirkung des C10 ausmacht, und ein transzellulärer Mechanismus unterschieden.

Die parazelluläre Permeationsverbesserung kommt durch eine Aktivierung der Phospholipase C zustande. Diese führt zu einer Erhöhung der Menge an Inositoltriphosphat, die wiederum die Erhöhung der intrazellulären Calciumspiegel bewirkt. Diese führen zur Kontraktion Calmodulin abhängiger Aktin-Myosin-Filamente, was die Öffnung von tight junctions verursacht [135, 138]. Die transzelluläre Permeabilitätsverbesserung kommt durch Membranperturbation zustande. Eine Interaktion von C10 mit Membranproteinen und -lipiden wurde durch die vermehrte Freisetzung von Phospholipiden im Rattendarm und die Verwendung von Bürstensaummembran-Vesikeln, die fluoreszenzmarkiert wurden, nachgewiesen [139, 140].

Chitosan und Chitosan-Derivate



Chitosan – Acetylierungsgrad 33%

Bei Chitosan handelt es sich um ein Polysaccharid, das aus Glucosamin und N-Acetylglucosamin-Einheiten aufgebaut ist. Chitosan ist bei neutralem und basischem pH unlöslich und bildet Salze mit verschiedenen Säuren, z.B. mit Glutaminsäure und Salzsäure. Chitosan wird durch Deacetylierung aus Chitin gewonnen. Chitosan wird in großem Maßstab als Nahrungsmittelzusatz eingesetzt. Mittlerweile ist Chitosan mit verschiedenen Molekulargewichten, unterschiedlichen Viskositäts- und Acetylierungsgraden erhältlich [141, 142]. Die bioadhäsiven Eigenschaften von Chitosan wurden zuerst von Lehr und anderen an intestinaler Schweinemukosa beschrieben [143].

Eine Absorptionsverbesserung durch Chitosan wurde zum ersten Mal durch Illum et al. im Jahr 1994 beschrieben. In dieser Studie wurde demonstriert, dass durch eine 0,5%ige Chitosan Lösung die Absorption von Insulin über die nasale Mukosa von Ratten und Schafen signifikant verbessert werden konnte [77]. In weiteren Studien, in denen auch der Einfluss des Acetylierungsgrades und des Molekulargewichtes des Chitosans untersucht wurde, konnte die Verbesserung der Absorption von Insulin über die nasale Membran bestätigt werden. Dabei waren alle Chitosan-Verbindungen wirksam [78]. Ein weiterer Test an menschlichen Probanden zeigte, dass die tägliche Applikation einer Chitosan Lösung über den Zeitraum von einer Woche keine Schäden verursachte [144]. Die erste Studie, in der die Verbesserung der Permeation einer Substanz über Caco-2-Zellen durch Chitosan gemessen wurde, stammt ebenfalls aus dem Jahr 1994. Artursson und andere zeigten in dieser Studie, dass bereits eine Konzentration von 0,1% Chitosan den parazellulären Transport von ^{14}C -Mannitol bei pH 4,0 und 4,9 signifikant verbesserte. Bei pH 6,0 wurde der Effekt erst bei Einsatz von 0,25%

Chitosan signifikant. Die bessere Wirksamkeit bei niedrigeren pH-Werten wurde auf den höheren Ionisierungsgrad von Chitosan im Sauren zurückgeführt [79].

In den Jahren 1996-1999 wurden von Schipper und anderen verschiedene Studien zum genauen Wirkmechanismus von Chitosan durchgeführt. In der ersten Studie wurde der Einfluss des Acetylierungsgrades und des Molekulargewichtes von 8 verschiedenen Chitosanen auf die Permeationsverbesserung von ^{14}C -Mannitol und auf die Toxizität im Caco-2-Modell bestimmt. Chitosane mit niedrigem Acetylierungsgrad (15%) zeigten eine dosisabhängige Toxizität und waren effektive Permeationsverbesserer. Chitosane mit hohem Acetylierungsgrad wiesen eine geringe Toxizität auf, allerdings waren hier nur Verbindungen mit hohem Molekulargewicht effektive Permeationsverbesserer [145]. Die gleichen Autoren untersuchten in einer weiteren Studie den Einfluss von Mukus auf die Wirksamkeit von Chitosan. Die durch Chitosan bewirkte Verbesserung des Transports von Atenolol war über Rattenjejenum und von Mukus bedeckte HT29-H Goblet Zellen deutlich geringer als über mukusfreie Caco-2-Zellen. Es wurde angenommen, dass der Mukus eine Barrierefunktion erfüllt, welche die Bindung von Chitosan an die Zelloberfläche verhindert [146]. Ein Grund für den geringeren Effekt in Gegenwart von Mukus könnte auch die Bindung des positiv geladenen Chitosans an negativ geladenes Glykoprotein im Mukus sein. Eine solche Bindung wurde 1998 von He und anderen postuliert [147]. In einer weiteren Studie konnte der Wirkmechanismus des Chitosans teilweise aufgeklärt werden. Chitosan führte zu einer Umlagerung des F-Aktins des Zytoskelett und des tight junction-Proteins ZO-1. Durch die Öffnung von tight junctions kam es zu verstärktem parazellulären Transport. Durch die Zugabe negativ geladenen Heparins, welches an das Chitosan gebunden wurde, konnte gezeigt werden, dass die positive Ladung des Chitosans, die nur bei niedrigem pH-Wert gegeben ist, die Voraussetzung für das Auslösen dieses Mechanismus bildet [148]. In späteren Publikationen konnte im Caco-2-Modell auch ein Einfluss von Chitosan auf die tight junction Proteine Occludin [149, 150] und Claudin-1 [151] gezeigt werden. In einer weiteren Studie wurde demonstriert, dass durch Inhibition der Proteinkinase C der Rückgang des TEER-Wertes durch Chitosan in Caco-2-Zellen verhindert werden kann. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Öffnung von TJs durch Chitosan über Proteinkinase C vermittelt wird [152]. In einer 2012 veröffentlichten Studie wurde sowohl von einem Rückgang des

parazellulären als auch des transzellulären Widerstandes berichtet. In dieser Studie wurde die Aktivierung eines Chlorid-Bicarbonat-Austauschers und eine darauf folgende Veränderung des intrazellulären pH-Wertes, welche zur Öffnung von tight junctions führt, als Wirkmechanismus von Chitosan vermutet [153].

Bei der ersten in-vivo-Studie zur Absorptionsverbesserung wurde Ratten intraduodenal Buserelin mit Chitosan Hydrochlorid verabreicht. Da der pH in diesem Darmbereich bei 6,7 liegt und sich Chitosan bei annähernd neutralem pH nicht in Wasser lösen lässt, wurde bei der Studie das Salz eingesetzt. Wenn Buserelin in Puffer verabreicht wurde, der 1,5% Chitosan-HCl enthielt, erhöhte sich dessen Bioverfügbarkeit signifikant von 0,1% auf 5,1% [80]. In einer weiteren Studie untersuchten Borchard und andere die Effektivität eines anderen Chitosan-Salzes, Chitosan-Glutamat, als Permeationsverbesserer. Die Untersuchungen wurden mit dem Caco-2-Modell bei pH 7,4 durchgeführt. Der Zusatz von Chitosan-Glutamat hatte keinen Einfluss auf den Transport der beiden Modellsubstanzen ¹⁴C-Mannitol und FITC-Dextran. Der Grund für die fehlende Wirkung ist aller Wahrscheinlichkeit nach der niedrige Ionisierungsgrad des Chitosan in diesem pH-Bereich [154]. Die pH-Abhängigkeit von Chitosan Salzen wurde in einer weiteren Studie von Kotze und anderen untersucht. Der Einfluss von Chitosan-HCl und Chitosan-Glutamat auf den Transport von ¹⁴C-Mannitol über einen Caco-2-Monolayer wurde bei pH 7,4 und bei pH 6,2 untersucht. Während beide Salze bei pH 7,4 keinen Effekt auf Transport und TEER-Wert zeigten, führten beide bei pH 6,2 zu einer signifikanten Reduktion des TEER-Wertes und zu einem signifikanten Anstieg des Mannitol-Transports. Der Zusatz von 0,5% Chitosan HCl bewirkte eine Erhöhung um den Faktor 36, der Zusatz von 1,5% Chitosan-Glutamat eine Erhöhung um den Faktor 25. Die Autoren forderten die Entwicklung neuer Chitosan-Derivate mit verbesserter Löslichkeit bei neutralem und basischem pH, um eine Wirksamkeit in tieferen Darmabschnitten zu erzielen [81].

Trimethylchitosan

Um das Problem zu lösen, wurde das Derivat Trimethylchitosan (TMC) synthetisiert. TMC ist in verschiedenen Quaternisierungsgraden (QG) erhältlich, jedoch kann man bereits mit TMC mit einem relativ geringen QG von 10% problemlos eine 10%ige Lösung in wässrigem Medium über einen pH Bereich von 1-9 herstellen. Die beste Löslichkeit weist TMC mit einem QG von 40% auf [155]. Kotze und andere zeigten in mehreren Studien, dass TMC ein wirksamer Permeationsverbesserer ist. Eine 1,5%ige Lösung von TMC ergab zwar im Vergleich zu 1,5%igen Lösungen von Chitosan-HCl und Chitosan-Glutmat eine geringere Wirksamkeit bei der Verbesserung des Transports von Buserelin und 8-Arginin-Vasopressin über einen Caco-2-Monolayer. Aufgrund der besseren Löslichkeit konnte jedoch auch eine 2,5%ige Lösung von TMC hergestellt werden, die deutlich effektiver war [85]. In einer weiteren Studie demonstrierten die gleichen Autoren, dass durch TMC sowohl der Transport von kleinen Molekülen wie ^{14}C -Mannitol (Molekulargewicht 182,2 Da) als auch der Transport von großen Molekülen wie ^{14}C -PEG-4000 (Molekulargewicht 4000 Da) über einen Caco-2-Monolayer deutlich verbessert werden konnte [86]. Es folgten in-vivo-Studien, in denen gezeigt wurde, dass durch Zusatz von 1% TMC (60% QG) die Bioverfügbarkeit von Octreotid nach intrajejunaler Applikation in Ratten um das 5-fache erhöht werden konnte. Der Zusatz von 1% Chitosan-HCl zeigte hingegen keinen Effekt [156].

Der QG bestimmt die Anzahl an positiven Ladungen, die zur Interaktion mit dem negativ geladenen Epithel zur Verfügung stehen. Der Einfluss des QG wurde ebenfalls in einigen Studien untersucht. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass TMC mit einem QG von 60% im Vergleich zu TMC mit einem QG von 40% deutlich effektiver in der Verbesserung des Transports von ^{14}C -Mannitol über einen Caco-2-Monolayer war. Die höhere Effektivität von TMC mit einem QG von 60% war bei 5 getesteten Konzentrationen zwischen 0,05% und 1% gleichbleibend [157]. TMC mit einem QG von 60% erhöhte die Insulin Absorption nach nasaler und rektaler Applikation in Ratten bei neutralem pH, während TMC mit einem QG von 12,3% und Chitosan-HCl unwirksam blieben [158]. Durch gleichzeitige Gabe von 1% TMC mit einem QG von 60% konnte die Bioverfügbarkeit von Buserelin nach intraduodenaler Applikation in Ratten von 0,8% auf 13% erhöht werden. Die gleichzeitige Gabe von TMC mit einem QG von 40% bewirkte einen Anstieg der Bioverfügbarkeit auf 6%

[89]. Da in diesen Studien keinerlei irreversible Schäden an der Mukosa gefunden wurden, stellt TMC eine viel versprechende Substanz für die Erhöhung der Bioverfügbarkeit von kationischen oder ungeladenen Molekülen dar. TMC bildet jedoch Salze mit anionischen Verbindungen.

Mono-Carboxymethylchitosan

Bei Mono-Carboxymethylchitosan (MCC) handelt es sich um ein Chitosan Derivat mit einem Substitutionsgrad von 87-90%, das polyampholytische Eigenschaften aufweist. Konzentrationsabhängig bildet MCC Gele oder Lösungen. Im Neutralen oder Basischen bildet es keine Aggregate mit Polyanionen wie Heparin mit niedrigem Molekulargewicht (LMWH), während es im Sauren aggregiert.

In einer Studie wurde die Effektivität von MCC mit niedriger und hoher Viskosität als Permeationsverbesserer für LMWH in vitro und in vivo untersucht. Alle Versuche wurden bei pH 7,4 durchgeführt. Im Caco-2-Modell wurde eine im Vergleich zu TMC höhere Konzentration benötigt, um den TEER-Wert um 50% zu senken. Beide MCC Varianten verbesserten den Transport von LMWH über den Caco-2-Monolayer in Konzentrationen von 3-5% signifikant, wobei das niedrig viskose MCC die höhere Effektivität zeigte. Das Polymer verursachte keine Schäden an der Zellmembran und der TEER-Wert stieg wieder auf den ursprünglichen Stand an. Nach gleichzeitiger intraduodener Gabe von LMWH und 3% niedrig viskosem MCC in Ratten stieg die LMWH Konzentration im Blut für 3 Stunden auf ein therapeutisches Level an [83].

Neue Chitosan Derivate

Bei N-Sulfonato-N,O-Carboxymethylchitosan (SNOCC) handelt es sich um ein weiteres Chitosan-Derivat, das kompatibel mit Polyanionen wie LMWH ist. Für eine Studie wurde es in 3 Viskositäten hergestellt. Alle Varianten führten zu einem konzentrationsabhängigen Rückgang des TEER-Wertes im Caco-2-Modell. Alle 3 Varianten verbesserten auch die

Permeation von LMWH, FITC-Dextran und ^{14}C -Mannitol signifikant, wobei die hochviskose Variante die größte Effektivität zeigte. Nach gleichzeitiger intraduodener Gabe von LMWH und den beiden viskoserer Varianten von SNOCC in Ratten erhöhte sich die AUC von LMWH um Faktor 18,5 [159].

Trimethylchitosan-Cystein (TMC-Cys) wurde synthetisiert, um die Eigenschaften von TMC und Thiol-Polymeren zu verbinden. Es wurden Polyelektrolyt-Nanopartikel mit Insulin hergestellt. (TMC-Cys-NP). Diese zeigten eine im Vergleich zu TMC/Insulin NPs verbesserte Mukoadhäsion. Die TMC-Cys-NP zeigten eine im Vergleich zu Insulin-Lösung 3,3-11,7-fach höhere Permeation über Rattenileum. Die Bioverfügbarkeit von Insulin konnte nach Schlundsondierung von in Kapseln abgefüllten Nanopartikel in Ratten signifikant erhöht werden [91].

Die Effektivität von N-succinyl chitosan (NSC) als Permeationsenhancer für Isosorbitdinitrat (ISDN) nach intranasaler Applikation wurde in situ und in vivo getestet. In beiden Modellen zeigte NSC signifikant höhere Effektivität als die Vergleichssubstanz Chitosan. Darüber hinaus konnten keinerlei Schäden an der Nasenschleimhaut oder den Zilien festgestellt werden [92].

EDTA

Die Effektivität von EDTA als Permeationsenhancer konnte bereits im Jahr 1961 von Windsor und Cronheim zum ersten Mal nachgewiesen werden. Ratten und Hunden wurden 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht Heparin mit und ohne Zusatz von 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht EDTA peroral verabreicht. Der Zusatz von EDTA bewirkte eine deutliche Steigerung der Aktivität des Heparins in vivo [49]. 1971 bewiesen Kunze und andere, dass durch die gleichzeitige Gabe von 30 mM EDTA die Bioverfügbarkeit verschiedener Konzentrationen von Salicylsäure nach intrajejunaler Gabe bei Ratten signifikant gesteigert werden konnte. Es wurde gezeigt, dass EDTA nur die Absorption hydrophiler Substanzen verbesserte [50]. In einer 1987 veröffentlichten Studie wurde festgestellt, dass durch 1% EDTA die jejunale Absorption von Fosfomycin deutlich stärker verbessert werden konnte als die Absorption im

Colon [51]. Es folgten viele weitere Studien, in denen unter anderem ein verzögerter Effekt der Wirkung von EDTA im Vergleich zu anderen Enhancern festgestellt wurde. Gleichzeitig war EDTA in verschiedenen Studien, insbesondere im Vergleich zu Natriumdecanoat der schwächer wirksame Permeationsenhancer [160, 161]. In einer 1995 durchgeführten Studie wurde der Wirkmechanismus von EDTA als Permeationsverbesserer genauer beleuchtet. Ca^{2+} bildet mit EDTA Chelat-Komplexe, was die Senkung der extrazellulären Ca^{2+} -Spiegel bedingt. Es kommt zur Stimulierung der Proteinkinase C und zur Öffnung von tight junctions [138]. Wiederholt wurde über eine Verbesserung der Resorption von Eisen in Gegenwart von EDTA berichtet [162, 163]. Lange war nicht klar, ob diese Verbesserung durch die verbesserte Aufnahme eines Eisen-EDTA-Komplexes zustande kommt. In einer Studie aus dem Jahr 2008 konnte gezeigt werden, dass EDTA nur die parazelluläre Aufnahme von Eisen verbessert, was möglicherweise zu einer erhöhten Toxizität des Eisens führen könnte [164]. Ähnliche Effekte, wie sie mit EDTA zu erzielen sind, kann man aller Wahrscheinlichkeit nach auch mit anderen Chelat-Bildnern erzielen. So konnte mit Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) der Transport von Clondronat über einen Caco-2-Monolayer signifikant erhöht werden [53].

Eudragit E

Bei Eudragit E handelt es sich um ein kationisches Copolymer bestehend aus Dimethylaminoethyl-Methacrylat, Butyl-Methacrylat und Methyl-Methacrylat. In einer Studie aus dem Jahr 2008 von Grube et. al wurde die Effektivität von Eudragit E als Permeationsenhancer untersucht. Eudragit E verbesserte konzentrationsabhängig die apikale nach basolaterale Permeabilität von Mannitol, Talinolol und Trosipium über einen Caco-2-Monolayer. Dabei kam es zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des TEER-Wertes. Die beobachteten Effekte waren reversibel. Die Permeationsverbesserung trat bereits bei einer Polymerkonzentration von 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ein. Das ist insbesondere deshalb interessant, da Eudragit E von der FDA als inerte Substanz eingestuft wird und in zugelassenen Arzneimitteln in Mengen bis zu 139 μg enthalten ist. Die Autoren konnten mit Hilfe des Trypan-Blau Tests eine erhöhte Membran-Permeabilität nachweisen. Die elektronenmikroskopische

Untersuchung zeigte nach einer Behandlung des Monolayers mit 50 µg/ml Eudragit E für eine Stunde eine verringerte Anzahl an Mikrovilli, erweiterte Interzellularräume und an einigen Stellen sogar die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten. Bei den im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Studien mit Eudragit E an Ratten sollte der Beweis erbracht werden, dass die in vitro erzielte Permeationsverbesserung auf ein in-vivo-Modell übertragbar ist [23].

Carnitin-Fettsäureester

Palmitoyl-DL-Carnitinchlorid (PCC)

In einer 1986 veröffentlichten Studie wurde die Effektivität von Acylcarnitinen, welche Fettsäuren unterschiedlicher Länge enthielten, als Absorptionsverbesserer in Hunden und anästhesierten Ratten getestet. Dabei zeigte PCC die beste Wirksamkeit. Durch PCC konnten die Absorptionen von α -Methyldopa, Cytarabin, Cefoxitin, Gentamicin und eines Somatostatin-Analogons signifikant erhöht werden. Dabei zeigte PCC Wirksamkeit in Hunden und Ratten. PCC war sowohl im Dünndarm als auch im Kolon effektiv. Bei der Untersuchung des Gewebes konnten keine auffälligen Veränderungen an der Mukosa festgestellt werden [165]. In einer Studie aus dem Jahr 1992 konnte gezeigt werden, dass durch PCC (3 mg/Ratte) die Absorption von Cefoxitin bei Ratten aus verschiedenen Darmabschnitten verbessert werden konnte. PCC führte im Jejunum zu einer 22-fachen, im Ileum zu einer 16-fachen und im Kolon zu einer 32-fachen Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Cefoxitin aus Loops. Im Duodenum zeigte es allerdings keine Wirksamkeit. Die Effektivität von PCC lag dabei höher, wenn Wirkstoff und Enhancer in einer geschlossenen Loop appliziert wurden. Die Autoren erklärten dieses Ergebnis mit einer Verdünnung von PCC bei Applikation in einer offenen Loop [166]. Die Wirksamkeit von PCC als Permeationenhancer konnte in einer in-vivo-Studie nach peroraler Gabe von magensaftresistenten Kapseln in Hunden bestätigt werden. Die Hunde erhielten 12 mg Cefoxitin mit und ohne Zusatz von 24 mg PCC. Die Bioverfügbarkeit von Cefoxitin konnte durch Zusatz des PCC um mehr als das 10-fache erhöht werden. Bei Gabe von nicht

gecoateten Tabletten entfaltete das PCC keine Wirkung [72]. Bei einer Studie aus dem Jahr 2003, bei der die Eignung verschiedener Enhancer zur Verbesserung des Transports von Clodronat durch Caco-2-Zellen untersucht werden sollte, zeigte PCC im Vergleich zu EGTA und TMC eine geringe Wirksamkeit [53]. Der Wirkmechanismus von PCC ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In verschiedenen Studien mit Caco-2-Zellen konnte gezeigt werden, dass durch PCC die Zwischenzellräume erweitert werden. PCC öffnet tight junctions, wobei die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration keine Rolle spielt. Durch PCC wird die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle stark erhöht, wobei PCC offensichtlich von der apikalen Seite wirkte. PCC erweist sich vor allem für die Permeationsverbesserung von kleinen Molekülen mit einem Molekulargewicht von unter 10 kDa als gut wirksam [138, 167, 168].

Lauroylcarnitinchlorid (LCC)

In der oben genannten Studie aus dem Jahr 1986 wurde auch die Effektivität von LCC als Permeationsenhancer dargestellt. Durch LCC konnte ebenfalls die Absorption aller Testsubstanzen verbessert werden. LCC war dabei allerdings weniger wirksam als PCC [165]. In einer 1995 veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass durch die gleichzeitige Gabe von LCC oder PCC die Bioverfügbarkeit des Glykoprotein Iib/IIIa-Rezeptor Antagonisten DMP 728 nach peroraler Gabe in Hunden erhöht werden konnte. Wiederum lag die Wirkung von LCC im Vergleich zu PCC etwas niedriger [74]. In einer 1996 veröffentlichten Studie sollte durch die gleichzeitige Gabe eines Acylcarnitins die Absorption von Calcitonin nach nasaler Gabe in Ratten verbessert werden. Von den getesteten Acylcarnitinen zeigte LCC bei einer Konzentration von 0,1% die beste Wirksamkeit. Die Bioverfügbarkeit von Calcitonin konnte signifikant erhöht werden [169]. Aus der Gesamtheit der Studien lässt sich ableiten, dass es sich beim besser untersuchten PCC um den effektiveren Permeationsenhancer handelt.

Gallensalze

Gallensäuren werden in den Hepatozyten aus Cholesterin gebildet, in der Gallenblase gespeichert und bei einem entsprechenden Reiz ins Duodenum sezerniert. Gallensäuren sind essenziell für die Fettverdauung. Im Gastrointestinaltrakt liegen Gallensalze gewöhnlich in Form von Mischmizellen mit Lecithin, Cholesterol, Monoglyceriden und Fettsäuren vor. Erst durch das Emulgieren der Fette in Mizellen werden diese gelöst und zugänglich für Lipasen, beziehungsweise für die Absorption. Da sich der pH-Wert in der Galle im Alkalischen befindet, liegen Gallensäuren meist in Form ihrer Natriumsalze vor. Gallensäuren kommen im Körper häufig als sogenannte konjugierte Gallensalze vor. Sie sind dann an die Aminosulfonsäure Taurin oder an die Aminosäure Glycin gebunden. Man kann Gallensalze in Di- und Trihydroxy-Gallensalze einteilen. Zu den Trihydroxy-Gallensalzen gehören Natriumchololat (C), Na-glycochololat (GC), Na-taurochololat (TC). Zu den Dihydroxygallensalzen gehören Na-desoxychololat (DOC), Na-taurodesoxychololat (TDOC) und Na-glycodesoxychololat (GDOC). Je nach Stellung der beiden Hydroxygruppen wird bei den Dihydroxygallensalzen weiter unterschieden in Na-chenodesoxychololat (CDOC) und Na-ursodesoxychololat (UDOC). Durch die Bindung an Glycin oder Taurin ändern sich die Löslichkeit und die CMC von Gallensalzen. Während freie Gallensalze unterhalb eines pH-Wertes von 6,5 Präzipitate bilden, sind die Glycin-Konjugate oberhalb eines pH-Wertes von 4,5 löslich. Die Taurin-Konjugate erweisen sich bei allen physiologischen pH-Werten löslich [170-173]. Die durchschnittliche Komposition im Menschen enthält gewöhnlich 30 Mol% GC, 30 Mol% GDOC, 15 Mol% GDOC, 10 Mol% TC, 10 Mol% TCDOC und 5% TDOC [174].

Die Effektivität verschiedener konjugierter und unkonjugierter di- und trihydroxy-Gallensalze als Permeationsenhancer wurde in verschiedenen Modellen untersucht. Dabei wurden Konzentrationen der Gallensalze oberhalb und unterhalb der CMC untersucht. Es wurde auch die Effektivität von Mischmizellen, die Gallensalze enthielten, als Permeationsenhancer getestet.

Bei den Untersuchungen der reinen Gallensalze zeigte sich, dass die hydrophoberen Dihydroxygallensalze generell die besseren Permeationsenhancer darstellen [97, 98, 175].

Durch Konjugation der Gallensalze wird zwar die Hydrophobie erniedrigt, dabei bleibt jedoch die Effektivität als Permeationenhancer erhalten [98]. Eine Ausnahme stellt UDOC dar, das eine Hydroxy-Gruppe in β -Stellung, also auf der hydrophoben Ebene des Gallensalzes, enthält. Dadurch wird möglicherweise die Interaktion des Gallensalzes mit der Membran gestört, was eine im Vergleich zu anderen Dihydroxy-Gallensalzen stark reduzierte Wirksamkeit auslöst [175]. In einer Studie bewirkte die Gabe von TDOC in submizellarer Konzentration eine kleine, aber signifikante Erhöhung des Transports von Salicylat im Everted Sac Modell mit Rattenjejunum. Die Gabe einer mizellaren Konzentration verursachte eine starke Erhöhung des Effektes [102]. Bei der Untersuchung von Mischmizellen mit Gallensalzen hat sich heraus gestellt, dass Mischmizellen mit Dihydroxy-Gallensalzen weniger effektiv sind als die Gallensalze allein, während Mischmizellen mit Trihydroxygallensalzen eine im Vergleich zum reinen Gallensalz höhere Effektivität zeigen [101, 176-178].

In einer neueren Studie aus dem Jahr 2005 konnte gezeigt werden, dass sowohl mit Na-C (Natriumcholat) als auch mit Na-DOC (Natriumdesoxycholat) die Permeabilität verschiedener BCS Klasse 3 und 4 Substanzen über Rattenjejunum im Everted sac Modell signifikant erhöht werden konnte. Dabei übertraf Na-DOC erheblich die Effektivität von Na-C. Die Permeabilität der BCS Klasse 3 Substanzen Natrium-Cefotaxim und Ceftazidim-Pentahydrat wurde durch Zusatz von 1% Na-DOC um Faktor 15,21 bzw. 9,66 erhöht. Die Permeabilität der BCS Klasse 4 Substanzen Cyclosporin A und Lovastatin wurde um Faktor 2,38 bzw. 3,7 gesteigert. Die morphologischen Veränderungen, die durch Gallensalze an der Membran verursacht wurden, waren dabei niedriger als die Veränderungen, welche durch Cyclosporin ausgelöst wurden. Die Proteinfreisetzung war im Vergleich zur Kontrolle zwar erhöht, jedoch wesentlich niedriger als die durch EDTA verursachte Proteinfreisetzung [99]. In einer anderen aktuellen Studie, 2012 veröffentlicht, konnte gezeigt werden, dass mit Na-C die Permeation von Pravastatin über exzidiertes Rattenduodenum signifikant angehoben werden konnte. Wenn physikalische Mischungen des Wirkstoffes mit dem Gallensalz eingesetzt wurden, wurde die Permeation um Faktor 4,5 erhöht. Wenn stattdessen eine Solid Dispersion, die Wirkstoff und Enhancer enthielt, verwendet wurde, konnte sogar eine Verbesserung um Faktor 20,8 erreicht werden [179].

Es wurden verschiedene Wirkmechanismen für Gallensalze vorgeschlagen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass es durch Gallensalze zur Freisetzung von Phospholipiden, Proteinen und DNA aus Membranen kommt [180-182]. Darüber hinaus können Gallensalze Chelat-Bindungen mit Calcium eingehen, was zu einem Mechanismus analog dem von EDTA und anderen Chelatbildnern zur Öffnung von tight junctions führen würde [180]. Vermehrt wurde demonstriert, dass die durch Gallensalze bewirkten Effekte reversibel sind [183, 184].

In verschiedenen in-vitro- und in-vivo-Modellen konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Gallensalzen Membranschäden verursacht werden [185-187]. Da es sich bei Gallensalzen um körpereigene Substanzen handelt, kann man allerdings davon ausgehen, dass ihr Einsatz in der Regel nicht toxisch ist und evtl. verursachte Schäden reversibel sind. Darüber hinaus werden die Gallensalze CDOC und UDOC seit Langem zur Behandlung von Gallensteinen in Konzentrationen von ca. 1 g/Tag eingesetzt, also in einer höheren Konzentration, als sie zur Verbesserung der Permeation notwendig ist, und haben sich als sicher erwiesen [188, 189].

Amphiphile Substanzen

Neben den getrennt aufgeführten Gallensalzen und mittelkettigen Fettsäuren sind noch andere amphiphile Substanzen intensiv auf ihre Effektivität als Absorptionsverbesserer untersucht worden. Man kann diese grob in anionische und nichtionische Tenside einteilen.

Nichtionische Tenside

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass Tenside, welche sehr hydrophob und nicht wasserlöslich sind in der Regel schlechte Absorptionsverbesserer darstellen. Sehr hydrophile Tenside können sich nicht in der hydrophoben Umgebung des Bilayers anlagern und stellen ebenfalls keine guten Absorptionsverbesserer dar. In der Vergangenheit wurden vor allem Polyoxyethylenether (POE) untersucht, welche aus einer Alkylkette variabler Länge und einer

Polyoxyethylenkette variabler Länge bestanden, die über eine Etherbindung verbunden waren. Ichikawa und andere untersuchten die Verbesserung der rektalen Insulin-Aufnahme nach Applikation von Suppositorien in Kaninchen, welche 0,5% POEs verschiedener Kettenlänge enthielten. Dabei zeigten die Suppositorien mit C12/POE-9 die beste Wirksamkeit [103]. Walters et al untersuchten die Permeabilitätsverbesserung einer polaren Modellsubstanz durch die Magenmukosa von Kaninchen, die durch verschiedene POEs bewirkt wurde. In ihren Untersuchungen zeigte C12/POE-10 die beste Wirksamkeit [104]. In einer anderen Studie von Guarini und anderen waren Ether mit C16- und C18-Alkyl-Ketten effektiver in der Verbesserung der Absorption von oral appliziertem Heparin in Ratten als Ether, die C12-Ketten enthielten [190]. Vermutlich ist der zugrunde liegende Mechanismus der Absorptionsverbesserung mit dem Mechanismus der Gallensalze vergleichbar. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass POEs zur Freisetzung von Proteinen aus der Membran und zur Hämolyse von Erythrozyten führen können [191, 192]. In einer neueren Studie aus dem Jahr 2011 konnte nachgewiesen werden, dass durch die nichtionische amphiphile Substanz Labrasol die Aufnahme von Ganciclovir in Ratten signifikant verbessert wird. Es wurde mit der in-situ-single-pass perfusion Technik gearbeitet. In Gegenwart von 10% Labrasol erhöhte sich dabei die AUC von 8,05 auf 14,45 [105]. In einer anderen Studie aus dem Jahr 2011 wurde die Verbesserung der Aufnahme von Berberin durch TPGS untersucht. Nach oraler Gabe in Ratten konnte durch Zusatz von 2,5% TPGS die AUC von Berberin um Faktor 1,9 erhöht werden. Neben einer Verbesserung des parazellulären Flux durch TPGS vermuteten die Autoren jedoch auch eine Hemmung von P-Gp als möglichen Mechanismus [57].

Anionische Tenside

Typische Vertreter für anionische Tenside sind Natriumdodecylsulfat (SDS) und Dioctylnatriumsulfosuccinat (DOSS).

Es ist schon sehr lange bekannt, dass SDS in der Lage ist, Lipidmembranen zu spalten und Proteine zu denaturieren. Dadurch war es naheliegend zu überprüfen, ob sich SDS als Permeationenhancer eignet. In verschiedenen Studien, die mit unterschiedlichen Tierarten

durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass durch SDS die Absorption verschiedener Substanzen deutlich verbessert werden kann [54, 55, 103, 193]. Der Wirkmechanismus von SDS ist dabei vergleichbar mit dem Mechanismus der Gallensalze. SDS zeigt in höheren Konzentrationen eine im Vergleich zu anderen Hilfsstoffen hohe Toxizität. In verschiedenen Spezies konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von SDS zur Degeneration von Mitochondrien, zum Absterben von Blutzellen, zum Verschwinden von Mikrovilli und zur Degeneration der Epithelzellen führt [194, 195]. Daher hat die U.S. Food and Drug Administration (FDA) Höchstmengen für die Menge an SDS in verschiedenen Arzneiformen festgelegt. Die Höchstmenge an Hilfsstoff in einer Tablette, die für die orale Gabe bestimmt ist, liegt bei 51,69 mg SDS (FDA Inactive Ingredient Database).

Auch die Wirksamkeit von DOSS als Absorptionenhancer konnte in mehreren Spezies gezeigt werden [56, 196]. DOSS hat in Ratten zu histologischen Schäden geführt [197]. Da DOSS allerdings auch als Laxans zugelassen ist, ist davon auszugehen, dass Schäden, die durch DOSS in vivo hervorgerufen werden, eher gering und reversibel sind.

Andere Substanzen – Mittelkettige Glyceride, Carbopol

Mittelkettige Glyceride

Bei sogenannten mittelkettigen Glyceriden (MCGs) handelt es sich um Mono- und Diglyceride von Octanoat und Decanoat. Oftmals enthalten die Gemische auch kleine Mengen Triglyceride und länger- oder kürzerkettige Fettsäurereste. Da die Glyceride schlecht wasserlöslich sind, werden sie oft zusammen mit einer amphiphilen Substanz verwendet, welche die Löslichkeit verbessern soll.

Die Wirksamkeit von MCGs als Absorptionsverbesserer wurde in vielen in-vitro- und in-vivo-Studien demonstriert [69, 70, 198, 199]. Beispielsweise konnte bei gleichzeitiger peroraler Gabe von MCGs mit Cefmetazol in magensaftresistenten Kapseln eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit von 6% auf 65% erreicht werden. Durch das gleiche System konnte auch die orale Bioverfügbarkeit von Ceftriaxon in Affen verbessert werden [200]. In einer in-

vivo-Sicherheitsstudie konnten keine morphologischen Veränderungen nach Gabe von MCGs in Ratten, Kaninchen oder Hunden festgestellt werden [201]. In einer 2009 veröffentlichten Studie wurden MCGs erfolgreich zur Verbesserung der Penetration von Progesteron über Schweinehaut benutzt [202]. Der Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Im Caco-2-Zellmodell konnte eine Reduktion des TEER-Wertes festgestellt werden [69], was auf die Verbesserungen des parazellulären Transports schließen lässt. Andere Ergebnisse deuten auf eine Permeationsverbesserung über den transzellulären Weg hin [108].

Carbopol

Bei Carbopol handelt es sich um ein quervernetztes Polyacrylat-Polymer. Carbopol besitzt mukoadhäsive Eigenschaften. Verschiedene Formulierungen mit Carbopol wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Absorption verschiedener Wirkstoffe nach intestinaler, bzw. nasaler Applikation zu verbessern.

In einer 1997 veröffentlichten Studie konnte nach intrakolonaler Applikation von Calcitonin aus einer Submikron-Emulsion mit Carbopol 940 eine im Vergleich zur Lösung von Calcitonin in NaCl um Faktor 7 verbesserte absolute Bioverfügbarkeit von 14,7% erreicht werden [203]. In einer anderen Studie aus dem Jahr 2006 gelang es die Permeation von Metoclopramid (MCP) über die Nasenmukosa von Rindern ex vivo und die Bioverfügbarkeit von MCP in vivo in Schafen signifikant zu verbessern. Dazu wurden Formulierungen von MCP mit Carbopol 981 in Form von Pulvern und Lösungen benutzt [204]. Es konnten keinerlei morphologische Veränderungen an der Nasenmukosa festgestellt werden. Als möglicher Mechanismus wurde die durch das mukoadhäsive Carbopol verlängerte Kontaktzeit des Wirkstoffes mit der Membran angegeben.

1.5.4. Luminale Reaktionen

Im Folgenden soll ein Überblick über luminale Interaktionen von Wirkstoffen mit bestimmten Hilfsstoffen gegeben werden, welche zu einer veränderten Aufnahme des Wirkstoffes führen. In den meisten Fällen handelt es sich um unbeabsichtigte Reaktionen von Wirk- und Hilfsstoff, die zur Bildung schwer löslicher oder schwer permeabler Komplexe führen. Bei anderen Interaktionen wurde versucht, eine Substanz durch Komplexierung mit einem Hilfsstoff membrangängiger zu machen. Einen weiteren Mechanismus stellt die Beeinflussung des pH-Wertes dar, welche zu einer besseren oder schlechteren Löslichkeit und/oder Freisetzung eines Wirkstoffes führen kann.

Natrium-N-(8-(2-hydroxybenzoyl)amino)caprylat (SNAC)

Bei SNAC handelt es sich um ein Aminosäurederivat, dessen Eignung als Permeationenhancer für Heparin bereits in vielen Studien untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass durch SNAC die Permeation von Heparin sowohl durch Caco-2-Zellen als auch durch Rattenileum und Rattenkolon signifikant erhöht wird [126, 205, 206]. Als Mechanismus wurde eine Interaktion zwischen Heparin und SNAC beschrieben, die zu einem verbesserten transzellulären Transport des Heparins führt. Dabei handelt es sich um einen spezifischen Mechanismus. Es kommt es zu keinerlei sichtbaren Veränderungen oder einer generell höheren Permeabilität der Membran [207]. Mittlerweile wurden klinische Studien der Phasen I-III durchgeführt. In den Studien der Phasen I und II konnte gezeigt werden, dass durch die orale Verabreichung von SNAC-Heparin vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können wie durch die subkutane Injektion von LMWH. Heparin-SNAC könnte demnach sowohl für die Prophylaxe als auch für die Behandlung einer Vielzahl thrombotischer Erkrankungen verwendet werden. Bei den Studien konnte durch die orale Verabreichung von Heparin-SNAC gute therapeutische Erfolge erzielt werden. Heparin-SNAC wurde in der Regel gut vertragen und führte zu keinerlei unbekanntem, schwerwiegenden, unerwünschten Wirkungen [127, 128]. In den klinischen Studien der Phase III wurden etwas widersprüchliche Ergebnisse gefunden. Es handelte sich um eine Doppelblindstudie, an der

2264 Patienten teilnahmen. Der Testgruppe wurde eine Lösung von Heparin-SNAC beginnend 4 Stunden nach der Operation bis 27-30 Tage nach der Operation in einer Hoch- und eine Niedrigdosis Variante oral verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt im gleichen Zeitraum zwei Mal täglich 30 mg des LMWH Enoxaparin der Firma Aventis subkutan. In der Testgruppe kam es bei 13,9% der Patienten, die die hohe Dosis erhalten hatten und bei 18,6% der Patienten, die die niedrige Dosis erhalten hatten zu einer venösen Thromboembolie. Die schlechten Ergebnisse wurden auf eine unerwartete schlechte Verträglichkeit des flüssigen Heparins und eine daraus resultierende schlechte Compliance zurückgeführt. Trotz dieser Ergebnisse konnte der Beweis erbracht werden, dass mit SNAC eine oral wirksame Heparin-Variante hergestellt werden kann [208].

Papain

Im Jahr 2006 wurde eine Studie von Grabovac und anderen veröffentlicht, in denen eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit von LMWH durch die Kombination des Wirkstoffes mit Papain erreicht wurde. Zunächst wurde die Permeabilität von LMWH und Papain in molaren Raten von 1:2, 1:1 und 2:1 über Rattenjejunum in einer Ussing-Kammer gemessen. Da die 1:1-Mischung am effektivsten war, wurde diese Ratten als Tablette mit dem Hilfsstoff Hydroxyethylcellulose peroral verabreicht. Dadurch konnte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe 7-fache Erhöhung der Plasma Anti-Xa-Aktivität erreicht werden. Die relative Bioverfügbarkeit der Tabletten gegenüber der subkutanen Injektion betrug 9,2%, die relative Bioverfügbarkeit der Kontrollgruppe betrug 2,4%. Als Mechanismus wurde eine Komplexierung zwischen Papain und Heparin vorgeschlagen, welche durch Reaktion der kationischen Papain- und der anionischen Heparin-Gruppe zustande kommt. Dadurch wird die intestinale Permeabilität signifikant verbessert [125].

Natriumhydrogencarbonat

In einer 1990 veröffentlichten Studie wurde festgestellt, dass Ibuprofen aus Kapsel-Formulierungen, die Natriumhydrogencarbonat (NaHC)(t_{\max} 0,4h) enthielten, wesentlich schneller freigesetzt wurde, als aus Kapsel-Formulierungen mit Aluminiumhydroxyd (t_{\max} 3,1h) [209, 210]. Der Grund dafür war zunächst unklar. In einer weiteren Studie konnte geklärt werden, dass es aufgrund der Gasentwicklung durch NaHC zu einem schnelleren Zerfall der Kapsel in vivo kommt. Auch die Freisetzung und die Magenentleerungszeit wurden beschleunigt. Während auch C_{\max} bei Verwendung der NaHC-Kapseln im Vergleich zur Kontrolle signifikant höher war, waren bei der AUC keine signifikanten Unterschiede zu beobachten.

In einer weiteren Studie aus dem Jahr 1990 wurde beschrieben, dass durch Zusatz von NaHC zu Erythromycinacistrat Kapseln die AUC und die C_{\max} von Erythromycin beide verdoppelt werden konnten. Die Autoren fanden zwei Ursachen für die verbesserte Bioverfügbarkeit. Zum einen lässt der Zusatz von NaHC analog zur oben beschriebenen Ibuprofen Studie die Kapseln schneller zerfallen. Es stellt sich eine bessere Verteilung des Erythromycins im Magen ein. Zum anderen führt die durch NaHC bewirkte Erhöhung des pH-Wertes im Magen zu Inhibition des Abbaus von Erythromycin zum unwirksamen Anhydroerythromycin [112]. Es wurde die generelle Schlussfolgerung getroffen, dass durch Zusatz von NaHC zu Erythromycin-Formulierung die Bioverfügbarkeit von Erythromycin verbessert werden kann.

Calciumsulfat

In den Jahren 1968 und 1969 kam es zu einem Aufsehen erregenden Fall in Australien. Eine große Zahl von Patienten, die eine neue Formulierung des Antiepileptikums Phenytoin erhalten hatten, zeigten Vergiftungserscheinungen wie doppeltes Sehen, Erbrechen oder psychische Störungen. Bei nachfolgenden Untersuchungen wurden bei den Patienten stark erhöhte Phenytoin-Plasmaspiegel beobachtet. In der neuen Formulierung wurde unter anderem der Hilfsstoff Calciumsulfat gegen Lactose ausgetauscht. Bei der mechanistischen Aufklärung der Vorfälle konnte später gezeigt werden, dass Calciumsulfat mit Phenytoin

unlösliche Komplexe bildet, welche eine wesentlich schlechtere Permeabilität im Gastrointestinaltrakt aufweisen. Die Vergiftungen [114, 115, 211] kamen demzufolge durch die bessere Permeabilität aufgrund der fehlenden Komplexbildung zustande.

Superdesintegrants

Es wird immer wieder über Interaktionen zwischen Wirkstoffen und Superdisintegrants wie Croscarmellose (CC), Crospovidon (CP) oder Natriumstärkeglycolat (NSG) berichtet. In einer 2008 veröffentlichten Studie wurden die Interaktionen zwischen verschiedenen Superdisintegrants mit den Wirkstoffen Natriumsalicylat, Naproxen, Atenolol, Alprenolol, Diphenhydramin, Verapamil, Amitriptylin und Cetylpyridiniumchlorid untersucht. Es kam zu Ionenaustausch-Reaktionen zwischen ionischen Wirkstoffen und den anionischen Hydrogelen, die von NSG und CC gebildet werden. Zwischen neutralen Wirkstoffen und CP kam es zu hydrophoben Interaktionen. Bei physiologischen Salzkonzentrationen waren diese Interaktionen allerdings nicht mehr zu beobachten. Die Autoren postulierten, dass es mit amphiphilen Wirkstoffen zu stärkeren Interaktionen kommen könnte, da diese neben Ionenaustauschreaktionen mit den Polyelektrolyten aggregieren. Diese Interaktionen treten unabhängig von der Salzkonzentration auf und könnten demnach auch in vivo ein Problem darstellen [212]. In einer Studie aus dem Jahr 2012 wurden diese Interaktionen daher näher untersucht. Mittels Langmuir Adsorptionsmodell und isothermaler Titrationskalorimetrie konnte festgestellt werden, dass diese Wechselwirkungen eher schwach sind und ein Einfluss auf die Bioverfügbarkeit in vivo daher eher unwahrscheinlich ist [213].

Lactose

Lactose ist einer der am häufigsten verwendeten Hilfsstoffe in Tabletten. Bei Lactose handelt es sich um ein Disaccharid mit reduzierenden Eigenschaften. Es wurde vermehrt über Interaktionen zwischen Lactose und Wirkstoffen mit Aminogruppen berichtet. Am häufigsten kommt es dabei zwischen primären Aminogruppen und Lactose zu einer sogenannten Maillard-Reaktion, bei der sich über mehrere Zwischenstufen unter Abspaltung eines

Wassermoleküls der Wirkstoff an die Lactose anlagert. Meist wurden diese Reaktionen in Inkompatibilitätsstudien mit Mischungen des Wirkstoffes und Lactose beschrieben. Der Nachweis erfolgte in der Regel über Dynamic Light Scattering (DLS) oder Fourier-Transform-Infrarotspektrometrie (FTIR). Maillard Reaktionen mit Lactose wurden unter anderem für die Wirkstoffe Amlodipin [214], Baclofen [215] und Metformin [216] beschrieben, welche alle eine primäre Aminogruppe tragen. Obwohl primäre Aminogruppen die größte Reaktivität mit Lactose aufweisen, wurden auch Reaktionen mit Wirkstoffen mit sekundären Aminogruppen gezeigt. So kam es beispielsweise zwischen Lactose und Oxprenolol-HCl [217], Fluoxetin-HCl [218] und Ranitidin [219] zu Maillard-Reaktionen.

Magnesiumstearat

Magnesiumstearat ist ein gängiger Hilfsstoff, der bei der Herstellung fester Arzneiformen häufig als Feuchthaltemittel eingesetzt wird. Es wurde vermehrt über Interaktionen zwischen Magnesiumstearat und Acetylsalicylsäure (ASS) berichtet, bei denen unerwünschte Reaktionsprodukte wie Salicylsäure, Salicylsalicylsäure oder Acetylsalicylsalicylsäure entstanden [220, 221]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Einige Gruppen führten die Reaktion auf den Abbau von ASS in Anwesenheit von Wasser oder auf einen alkalischen pH zurück [222, 223]. Andere Gruppen gingen davon aus, dass die Reaktion durch die Anwesenheit von Verunreinigungen in Form von Magnesiumoxid katalysiert wurde [224].

Methylcellulose

Methylcellulose (MC) wird in verschiedenen Funktionen als pharmazeutischer Hilfsstoff eingesetzt. Es wird häufig als inertes Füllmittel in Tabletten verwendet. Darüber hinaus findet es in der Lebensmittelindustrie Anwendung als Verdickungsmittel und Stabilisator. Es wurde gezeigt, dass es in Gegenwart von MC zu einem um ein Vielfaches schnelleren Abbau von Enalapril kommt. Daneben konnte eine Interaktion zwischen Isosorbidmononitrat und MC

festgestellt werden [225]. Nach Lagerung war mittels HPLC ein neuer Peak erkennbar, welcher Hinweise auf eine chemische Reaktion gibt [226].

Povidon

Povidon wird in festen Arzneiformen häufig als Bindemittel eingesetzt. Weiterhin gelangt es als Filmbildner zum Einsatz. Interaktionen mit Povidon wurden für eine große Anzahl pharmazeutischer Wirkstoffe beschrieben. Beispielsweise kommt es zu Interaktionen zwischen Povidon und Sulfathiazol [227], Oxprenolol [217], Atenolol [228] und Haloperidol [229]. Da die Herstellung von Povidon durch freie Radikalpolymerisation aus N-Vinylpyrrolidon erfolgt, bei der Wasserstoffperoxid als Initiator eingesetzt wird, enthält kommerziell erhältliches Povidon meist Spuren von Peroxid. Daher sollte der Einsatz von Povidon zusammen mit Wirkstoffen, die durch Peroxide abgebaut werden, vermieden werden.

1.5.5. Andere Einflüsse

Disintegration / Dissolution

Zerfall und Freisetzung werden bei neuen Medikamenten ausführlich geprüft. Das Arzneibuch schreibt vor, dass bei schnell freisetzenden Tabletten der Zerfall innerhalb von 30 Minuten abgeschlossen sein muss und dass nach 30 Minuten 85% des Wirkstoffes freigesetzt sein müssen. Es gibt verschiedene Hilfsstoffe und Modulationen im Herstellungsprozess, die den Zerfall und die Dissolution von festen Arzneiformen beeinflussen. Als Beispiele für Hilfsstoffe, die einen Einfluss auf den Zerfall haben, seien an dieser Stelle die Superdesintegrants Croscarmellose und Crospovidon genannt. Bei Croscarmellose handelt es sich um ein quervernetztes Cellulosederivat, bei Crospovidon um quervernetztes Polyvinylpyrrolidon. Beide besitzen ein sehr hohes Wasseraufnahmevermögen, weswegen ihr Volumen bei Kontakt mit Wasser auf ein Vielfaches anschwillt. Auf diese Art führen beide

Substanzen zu einem stark beschleunigten Zerfall fester Arzneiformen [230]. Einflüsse von Hilfsstoffen auf Zerfall und Freisetzung sind lange bekannt und wurden sehr intensiv geprüft. An dieser Stelle sollen sie nur der Vollständigkeit wegen erwähnt werden.

Einflüsse auf Transporter

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass verschiedene als inert angesehene Hilfsstoffe wie Tenside, Lipide oder Löslichkeitsverbesserer die Absorption von Wirkstoffen durch Inhibition von Transportern beeinflussen können. In den meisten Fällen wird dabei die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen durch die Hemmung von Efflux-Transportern wie P-Gp erhöht. In einigen Studien wurde aber auch eine verringerte Wirkstoff-Absorption durch Inhibition von Influx-Transportern beschrieben. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Dimethyl- β -Cyclodextrin im Caco-2-Modell P-gp und MRP2 inhibiert und so die Permeabilität von Substraten dieser Efflux-Transporter beeinflusst [231]. Auch PEG 400, 2000 und 20000 führten durch Inhibition von P-gp im Caco-2-Zellmodell zu einem verringerten Efflux-Transport der Modellschubstanz Rhodamin 123 [232]. Dieses Thema wurde vermehrt in Reviews zusammengefasst und soll daher in dieser Arbeit nur am Rande erwähnt werden. Ein aktuelles Review, das sich intensiv mit der Thematik auseinandersetzt, ist die Arbeit von Goole und anderen aus dem Jahr 2010 [233].

Einflüsse auf die Disposition von Wirkstoffen

Es konnte gezeigt werden, dass durch Hilfsstoffe auch die Verteilung, der Metabolismus und die Ausscheidung bestimmter Wirkstoffe beeinflusst werden kann. Obwohl die meisten beobachteten Effekte nur nach intravasaler Gabe beobachtet werden konnten, traten einzelne Effekte auch nach peroraler Gabe auf.

Neben anderen Substanzen wurde ein Einfluss auf die Verteilung von Wirkstoffen durch Tween 80 beobachtet. So wurden Polylactid-co-Glycolid (PLGA) Nanopartikel, die Tween 80 enthielten erfolgreich dazu verwendet, nach oraler Gabe Estradiol ins Gehirn von Ratten zu

transportieren [234]. Eine durch Tween 80 bewirkte vermehrte Aufnahme von Methotrexat ins Gehirn wurde bei Mäusen beobachtet [235].

Verschiedene pharmazeutische Hilfsstoffe, allen voran nichtionische Tenside und Polymere, hatten Effekte auf Cytochrom-P-450-Enzyme. Unter anderem wurde in verschiedenen Systemen eine Inhibition von CYP3A4 durch Tween, PEG 400, Cremophor RH 40, SLS, Lecithin und Solutol gezeigt [236-244]. Ethanol wird über CYP2E1 verstoffwechselt und kann zur einer Induktion dieses Enzyms führen [245].

In Mäusen konnte darüber hinaus eine veränderte renale Ausscheidung von Methotrexat nach gleichzeitiger Gabe von Polysorbat 80 beobachtet werden [246].

Ein ausführliches Review über die Effekte von Hilfsstoffen auf die Disposition verschiedener Wirkstoffe der auch die Effekte von Wirkstoffen nach intravasaler Gabe einschließt, ist 2007 veröffentlicht worden [247].

2. Mechanismus der unerwarteten Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Trosipiumchlorid enthaltenden Polyelektrolytkomplexen

2.1. Einleitung

Die orale Bioverfügbarkeit einer Substanz hängt in erster Linie von ihrer Permeabilität und ihrer Löslichkeit ab. Obwohl es viele Anstrengungen gegeben hat, um die niedrige Permeabilität verschiedener Wirkstoffe zu verbessern, wird die Forschung an vielen neuen viel versprechenden Wirkstoffen jedes Jahr aufgrund einer zu niedrigen Permeabilität von forschenden Pharmaunternehmen eingestellt. Besonders hydrophile und geladene Substanzen, sowie Substanzen mit hohem Molekulargewicht besitzen oftmals eine niedrige Permeabilität.

Viele Hilfsstoffe beeinflussen die Absorption von Wirkstoffen über die intestinale Membran. Einige Hilfsstoffe wie beispielsweise Natriumdodecylsulfat können die intestinale Permeabilität verändern [248]. Andere Substanzen wie Tocopherylpolyethylenglycolsuccinat (TGPS) verändern die Absorption durch Inhibition von PGP [249]. Die meisten bisher untersuchten Substanzen haben einen Einfluss auf die tight junctions zwischen den Zellen des Gastrointestinaltraktes [250]. Beispiele für viel versprechende Substanzen dieser Art sind zum Beispiel die im allgemeinen Teil dieser Arbeit ausführlich beschriebenen Natriumdecanoat oder Trimethylchitosan. In letzter Zeit wurden auch hochspezifische Analoga des Zonula occludens Toxins synthetisiert, um gezielt tight junctions zu zerlegen [251, 252]. Dabei sollte allerdings beachtet werden, dass die Öffnung von tight junctions nicht zur spezifischen Absorptionsverbesserung eines bestimmten Wirkstoffes führt, sondern auch bewirken kann, dass andere Xenobiotica vermehrt systemisch aufgenommen werden. Darüber hinaus ist noch nicht endgültig geklärt, ob einige dieser Permeationenhancer dauerhafte Schäden der Membran verursachen können [253].

Einen weiteren Ansatz, um die Permeation zu verbessern, stellt der Einsatz mukoadhäsiver Substanzen dar. Diese bewirken eine verbesserte Wirkstoff-Absorption durch Anhaften an der Membran, eine verlängerte Transitzeit und die Schaffung eines höheren Konzentrationsgradienten des aktiven Wirkstoffes über die Membran. Es gab bereits

Versuche, mukoadhesive Substanzen für den nasalen [254], bukkalen [255], vaginalen [256] und gastrointestinalen [257] Weg zu nutzen. Verschiedene Polymerklassen kamen hier zur Anwendung. Vor allem positiv geladene Polymere wie Chitosan [258] und negativ geladene Polymere wie Polyacrylsäure [259] haben dabei eine Rolle gespielt. Darüber hinaus wurden auch Dendrimere, amphotere Polymere und synthetische Glykopolymere untersucht. Es gab außerdem verschiedene Ansätze, die Stärke der Mukoadhesion der verschiedenen Polymere sowie den Mechanismus der Mukus-Polymer-Interaktion zu untersuchen [260] [261].

Eine Klasse anionischer Polymere, die untersucht wurde, sind Carrageene. Bei Carrageenen handelt es sich um sulfatierte Polysaccharide. Sie werden aus Schnurtang extrahiert und finden breite Anwendung als Verdickungsmittel und Stabilisatoren in Lebensmitteln. Von den verschiedenen Carrageen-Arten spielen λ -, ι - und κ -Carrageen die größte Rolle. Der bedeutendste chemische Unterschied zwischen den einzelnen Klassen besteht in der Anzahl und Position der Sulfat-Gruppen. Im Gegensatz zu ι - und κ -Carrageen, welche in Anwesenheit bestimmter Ionen Gele formen, geschieht dies bei Verwendung von λ -Carrageen nicht [261]. Der Einsatz von Carrageenen als mukoadhesive Hilfsstoffe in der Pharmakotherapie wurde ebenfalls bereits untersucht. Dabei wurde versucht, Carrageene als Hilfsstoffe in vaginal- [262], bukkal- [263] und ophthalmisch [264] applizierten Arzneiformen einzusetzen. Song und Eddington konnten zeigen, dass Carrageen allein nicht zu einer verbesserten Permeation von Mannitol führt, aber dass es zusammen mit dem Permeationenhancer AT1002 die Permeation verbessert [110]. Der Effekt des Polymers zur Verbesserung der gastrointestinalen Permeabilität ist bisher nicht untersucht worden.

Des Weiteren ist auch die Nutzung von Polyelektrolytkomplexen mit mukoadhesiven Substanzen für die orale Pharmakotherapie bereits untersucht worden [265]. Diese bestehen im Allgemeinen aus einem ionisierbaren Polymer, das mit einem entgegen gesetzt geladenen Polymer oder Wirkstoff einen Komplex bildet. Als Beispiele für entsprechende Polymere seien Dextransulfat, Alginat, Carrageen und Chitosan genannt. Die Komplexierung basiert dabei auf Wasserstoffbrückenbindung, ionischen oder hydrophoben Interaktionen [266]. Polyelektrolytkomplexe, die mukoadhesive oder permeationsverbessernde Substanzen enthalten, können einen Wirkstoff vor Abbau im sauren Milieu des Magens schützen, zu einer verlängerten Transitzeit im Absorptionsfenster beitragen, zu einer Öffnung von tight junctions

führen oder zu einer direkten Aufnahme des Wirkstoffes durch engen Kontakt mit der mukosalen Membran führen [82]. Unter anderem wurde die Verwendung von Polyelektrolytkomplexen mit Chitosan zur oralen Gabe von Insulin bereits untersucht [267].

In dieser Studie wurde Trosipiumchlorid als Modellsubstanz verwendet. Die BCS-Klasse III Substanz zeigt gute Löslichkeit und schlechte Permeabilität und wird seit Langem zur Behandlung von Dranginkontinenz eingesetzt [11, 268, 269]. Bei Trosipium handelt es sich um eine positiv geladene quartäre Ammoniumverbindung, weshalb es gute Voraussetzungen zur Komplexbildung mit einem negativ geladenen Polymer mitbringt.

Ziel dieser Studie war es, die Effektivität von Polyelektrolytkomplexen mit λ -Carrageen zur Verbesserung der Permeabilität von Trosipiumchlorid und anderen BCS-Klasse III Substanzen zu untersuchen. Es wurden in-vivo-Studien durchgeführt, bei denen Ratten über eine Schlundsonde mit pulverförmigen Komplex gefüllte Hartgelatine kapseln verabreicht wurden. Außerdem wurde pulverförmiger Komplex direkt in geschlossene Dünndarmschlingen von Ratten appliziert. Da die statistische Analyse der Ergebnisse große Standardabweichungen offenbarte, wurden in-vitro-Permeations-Experimente über isolierte Segmente von Ratten jejunum in einer modifizierten Ussing-Kammer und über Caco-2-Zell-Monolayer durchgeführt, um den Mechanismus der Bioverfügbarkeits-Verbesserung aufzuklären.

2.2. Material und Methoden

2.2.1. Materialien

Die Wistar Ratten wurden von Charles River in Sulzfeld erworben. Die Caco-2-Zellen stammen aus der European Collection of Cell Cultures. DMEM, HBSS und Penicillin/Streptomycin wurden bei Gibco gekauft. Ketamin (Ketavet, Pfizer) und Xylazin (Rompun, Bayer) wurden von der Apotheke der Universitätsklinik Mainz bezogen. Trosipiumchlorid war ein Geschenk der K.H.S. Pharma Holding GmbH in Ingelheim. Die Polycarbonat Transwell stammten von Corning in Amsterdam.

Butylscopolamoniumhydrobromid, Atenolol und alle anderen Chemikalien stammten von Sigma-Aldrich in Schnelldorf.

2.2.2. Komplexierung

Die Komplexierung wurde von Capsulation in Berlin durchgeführt. Es wurden Komplexe hergestellt, welche aus alternierenden Schichten positiv geladenen Trospiums und negativ geladenen λ -Carrageens bestanden. Im Vorfeld wurden Tests mit verschiedenen negativ geladenen Polymeren wie Chondroitinsulfat und Carboxymethylcellulose durchgeführt, aber nur die Zugabe von λ -Carrageen zu einer Lösung von Trospiumchlorid führte zum Entstehen einer signifikanten Menge an Präzipitat. Daraufhin wurde das optimale Massenverhältnis zwischen Trospium und λ -Carrageen ermittelt. Zu diesem Zweck wurden die Präzipitate gewogen und die Trospiumkonzentration in der Lösung mittels HPLC bestimmt. Letztendlich wurde eine Lösung mit 25 mg/ml λ -Carrageen vorgelegt und langsam eine Lösung mit 100 mg/ml Trospium zugegeben. Das Massenverhältnis Trospium: λ -Carrageen lag bei 1,85:1. Das Präzipitat wurde gefriergetrocknet. Die exakte Prozedur der durchgeführten Layer-by-Layer-Komplexierung sowie die Struktur der entstehenden Partikel sind in einem Patent beschrieben [270].

2.2.3. Komplex-Charakterisierung

Um die Menge an Trospium in den gefriergetrockneten Partikeln zu bestimmen wurde der Komplex in HBSS gelöst. Die verwendete HPLC-Methode ist unter 2.1.11 beschrieben. Die Messung wurde drei Mal wiederholt. Die Freisetzungsprofile wurden in einer USP Typ 2 Apparatur in 500 ml verschiedener Freisetzungsmedien bei pH 1, 4,6 und 6,8 gemessen. Die Rührgeschwindigkeit lag bei 50 rpm und die Temperatur betrug 37°C. Für die Versuche wurden Hartgelatine kapseln der Größe 000 mit 100 mg Wirkstoff benutzt, um eine ausreichende analytische Empfindlichkeit zu gewährleisten. Nach 5, 10, 20, 30, 40, 55, 70, 90, 120 und 180 Minuten wurden Proben des Freisetzungsmediums entnommen. Die

Freisetzungsexperimente wurden fünf Mal bei jedem pH-Wert wiederholt. Die Konzentration des Wirkstoffes wurde mit UV/Vis-Spektrophotometrie bei einer Wellenlänge von 258 nm bestimmt.

2.2.4. In-vivo-Studien

Die in-vivo-Studien mit Ratten wurden von Pharmacelsus in Saarbrücken durchgeführt. Die Studien wurden vom zuständigen Landesuntersuchungsamt genehmigt. Für die Studien wurden männliche Wistar Ratten mit ungefähr 300 g Körpergewicht verwendet. Die Tiere wurden frühestens eine Woche nach Ankunft für Experimente benutzt. Den Ratten wurde 2-3 Tage vor der Verabreichung des Wirkstoffes ein Katheter in die Jugularvene eingesetzt. Die Tiere erhielten 16 Stunden vor den Experimenten keine Nahrung mehr. Mit Eudragit L überzogene, magensaftresistente Kapseln wurden benutzt, um dem Zerfall des Komplexes im sauren Milieu des Magens vorzubeugen. Eine Gruppe von Ratten erhielt 1,5 mg Trosipium in Form von Trosipium- λ -Carrageen-Komplex in Kapseln der Größe 9 per Schlundsonde. Die Dosis wurde dabei gleichmäßig auf 2 Kapseln aufgeteilt. Die andere Gruppe von Tieren erhielt ebenfalls 1,5 mg Trosipium in einer handelsüblichen schnell freisetzenden Formulierung (zerkleinertes Spasmolyt/Madaus) aufgeteilt auf 2 Kapseln per Schlundsonde. Blutproben wurden vor der Gabe und 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 18 und 24 Stunden nach der Gabe genommen. Die Proben wurden mit Heparin versetzt und sofort nach der Entnahme auf Eis gelagert. Durch Zentrifugieren der Proben bei 6000 g bei 4°C und Abtrennen der zellulären Bestandteile wurde Plasma gewonnen. Dieses wurde bis zur analytischen Vermessung bei -18°C gelagert.

2.2.5. Ligated-Loop-Studien

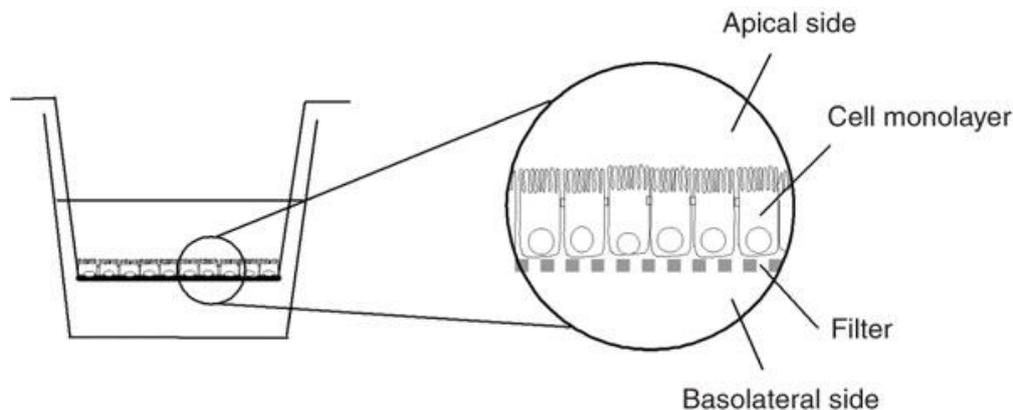
Für die Experimente wurden 90-110 Tage alte Wistar Ratten mit einem Gewicht von ungefähr 400 g benutzt. Die Experimente wurden frühestens eine Woche nach Erhalt der Tiere durchgeführt. Die Ratten hatten freien Zugang zu Standardnahrung und Leitungswasser bis zum Tag der Experimente. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin anästhesiert. Die Tiefe der Narkose wurde ständig über Zwischenzehenreflex und Schwanzreflex geprüft und bei Bedarf wurde weiteres Ketamin injiziert. Den Tieren wurde ein Venenkatheter mit Durchmesser 0,51 mm in die Jugularvene eingesetzt. Der Katheter wurde mit einer Lösung von 100 IE Heparin in 0,9% Natriumchloridlösung gefüllt, um die Bildung von Koagulaten zu verhindern. Eine 10 cm lange Darmschleife, beginnend 10 cm unterhalb des Treitzschen Bandes, wurde mit Ligaturen isoliert. Es wurde darauf geachtet, keine Nerven oder Blutgefäße zu verletzen. Einer Gruppe von Tieren wurde eine Lösung von 3 mg Trosipiumchlorid in isotonischer Kochsalzlösung in die Darmschleife injiziert. Die andere Gruppe erhielt eine Suspension von 4,7 mg Trosipium- λ -Carrageen-Komplex, welche die gleiche Menge Trosipium enthielt. Das Abdomen wurde geschlossen. Blutproben von 0,5 ml wurden nach 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten entnommen. Das Volumen wurde mit heparinierter Kochsalzlösung ersetzt. Die entnommenen Blutproben wurden unverzüglich mit Heparin versetzt und auf Eis gelagert. Nach 45 Minuten wurden die Blutproben bei 6000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde abgetrennt und bis zur Vermessung mittels LC/MS/MS bei -18°C gelagert. Die Tiere wurden durch Injektion einer gesättigten Kaliumchlorid Lösung in die Jugularvene unmittelbar nach Beendigung des Experimentes getötet.

2.2.6. Zellkultur

Die Zellen wurden bei 37°C und 90% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Zur Aufrechterhaltung wurden die Zellen einmal wöchentlich mit Trypsin/EDTA behandelt (0,24%/0,02%). Das Medium wurde an jedem zweiten Tag erneuert. Die Caco-2-Zellen

wurden auf 1,13 cm² Polycarbonat-Transwells mit einer Dichte von 100000 Zellen pro cm² ausgesät. Die Zellen wuchsen in DMEM, welchem 1% nichtessentielle Aminosäuren, 10% FBS, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt waren. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Experimente wurden 20-22 Tage nach dem Aussäen der Zellen durchgeführt, um eine optimale Entwicklung der zellulären Transportsysteme zu gewährleisten. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen 40-60 verwendet.

2.2.7. Caco-2-Transport-Experimente



Schematische Darstellung eines Caco-2 Monolayers (Hubatsch et al. 2007)

Vor dem Beginn der Experimente wurden die Zell-Monolayer einmal mit Transport-Puffer gewaschen. Der Donor-Puffer auf der apikalen Seite der Zellen bestand aus 0,6 ml HBSS mit 10 mM/l MES, die auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt war. Der Akzeptor-Puffer auf der basolateralen Seite der Zellen bestand aus 1,5 ml HBSS mit 10 mM/l HEPES, welche auf einen pH von 7,4 eingestellt war. In einer Reihe von Experimenten waren dem Donor-Puffer 2 mM/l Trosipiumchlorid zugesetzt. In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde die entsprechende Menge komplexiertes Trosipium direkt auf die apikale Seite der Zellen gegeben und mit Donor-Puffer aufgefüllt. Proben von 400 µl wurden von der basolateralen Seite nach

30, 60, 90 und 120 Minuten entnommen und unverzüglich wieder durch frischen Puffer ersetzt. Zu Beginn und am Ende des Experimentes wurden außerdem 100 µl Probe von der apikalen Seite der Zellen entnommen. Die Proben wurden bis zur Analyse mittels HPLC bei -18°C aufbewahrt [23].

2.2.8. Entnahme und Präparation des Rattengewebes

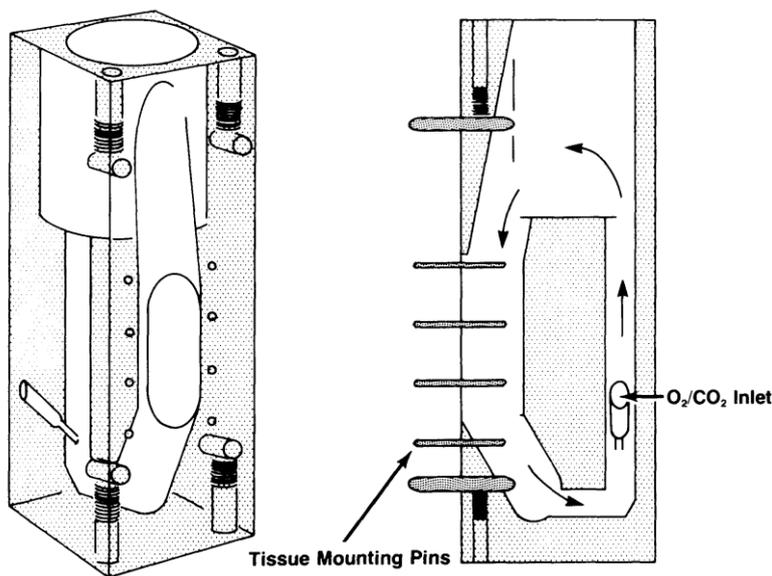
Für die Experimente wurden 90-110 Tage alte Wistar Ratten mit einem Gewicht von ungefähr 400 g benutzt. Die Experimente wurden frühestens eine Woche nach Erhalt der Tiere durchgeführt. Die Ratten hatten freien Zugang zu Standardnahrung und Leitungswasser bis zum Tag der Experimente. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin anästhesiert. Der Dünndarm wurde entnommen, zwei Mal mit Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (KBR) gespült und anschließend in eisgekühltem KBR aufbewahrt, der ständig mit Carbogen (95% O₂ / 5% CO₂) begast wurde. Nach der Darmentnahme wurden die Ratten durch Enthauptung getötet. Für die Experimente wurde proximales Jejunum (10-30 cm unterhalb des Treitzschen Bandes) verwendet. Die Darmsegmente wurden entlang der mesenterialen Grenze geöffnet. Die Serosa wurde vorsichtig entfernt. Dies geschah in eisgekühltem KBR unter ständiger Begasung mit Carbogen. Dabei wurde darauf geachtet keine Segmente mit Peyerschen Platten zu verwenden. Nach Entfernung der Serosa wurden die Darmsegmente vorsichtig in die Ussing-Kammern eingespannt.

2.2.9. Präparation der Humandarm-Resektate

Bei dem verwendeten Humandarm handelte es sich um Resektate aus der Chirurgie der Universitätsklinik in Mainz. Die Versuche wurden vom zuständigen Landesuntersuchungsamt genehmigt. Von allen Patienten wurde eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben. Für die Versuche wurde oberes Jejunum verwendet. Nach der chirurgischen Entnahme

wurden die Segmente unmittelbar in eisgekühlten KBR gegeben und ständig mit Carbogen begast. Nach dem Transport an die Universität wurden vorsichtig die Serosa und die Muskularis entfernt. Dies geschah in eisgekühltem KBR unter ständiger Begasung mit Carbogen. Danach wurden die Segmente in die Ussing-Kammern eingespannt.

2.2.10. Ussing-Kammer



Schematische Darstellung einer Ussing-Kammer (Grass, Sweetana 1988)

Allgemeines

Die Ussing-Kammer-Methode wurde von Ussing und Zerahn im Jahr 1951 entwickelt. Zunächst wurde die Methode benutzt, um den transepithelialen Natriumtransport über Froschhaut zu messen [271]. Heute wird die Methode zur Untersuchung der unterschiedlichsten Transportprozesse verwendet. Weiterhin eignet sich die Methode beispielsweise, um die Wirksamkeit von Permeationenhancern oder den Metabolismus verschiedener Wirkstoffe zu untersuchen [272, 273].

Die Methode ist mittlerweile eine Standardmethode zur Untersuchung von Transportprozessen geworden. In verschiedenen Studien wurde eine sehr gute Korrelation zwischen den mit Ratten- und Humangewebe in vitro ermittelten Permeabilitätskoeffizienten und der Permeabilität in vivo im Menschen festgestellt [274, 275]. Dabei ist durch die Messung des Widerstandes und der Potentialdifferenz bzw. des Kurzschlussstromes eine Möglichkeit vorhanden, während eines kompletten Versuches die mechanische Unversehrtheit und die Vitalität des Gewebes zu prüfen. Der vermutlich größte Nachteil der Methode besteht darin, dass, bedingt durch die fehlende Durchblutung des submukosalen Gewebes, die Transportprozesse mitunter nicht physiologisch erfolgen. Während eine Substanz in vivo nach Permeation über die Mukosa bereits im Blut abtransportiert werden kann, muss sie in vitro in der Ussing-Kammer auch die Submukosa und je nach Präparation des Gewebes auch die Muskelschichten und die Serosa durchdringen [276].

Aufbau der Kammer

Für diese Arbeit wurde eine Kammer benutzt, wie sie von Grass und Sweetana beschrieben wurde (Dipl.-Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen) [277]. Das System bestand aus 6 Plexiglas-Kammern, durch die 6 simultane Messungen ermöglicht wurden. Die Kammern verfügten über Einsätze, die auf einer Seite mit 8 Nadeln ausgestattet waren, auf die das Gewebe aufgespannt werden konnte. Die absorptive Fläche jeder Kammer betrug $0,67 \text{ cm}^2$. Die Kammern wurden während des Versuches zwischen zwei Aluminium-Platten befestigt, die an ein Wasserbad angeschlossen waren. Auf diese Weise wurde die Temperierung der Kammern ermöglicht. An der oberen Seite der Kammern befand sich eine Öffnung, durch die während des Versuches Proben genommen oder Puffer zugegeben werden konnte. Zusätzlich verfügte jede Kammerhälfte über eine Öffnung an der oberen Seite, durch die während des Versuches Carbogen eingelassen wurde. Dieses wurde über eine seitliche Bohrung in der Kammer von unten in die Versuchslösungen eingeleitet. Dadurch wurde einerseits das Gewebe mit Sauerstoff versorgt und andererseits eine ständige Zirkulation der Versuchslösung gewährleistet. Der Gasstrom konnte mit Gasdurchflussmessern für jede Kammer separat geregelt werden. In jeder Kammerhälfte befanden sich zwei Elektroden. Mit

den gewebnahen Spannungselektroden wurde die Potentialdifferenz zwischen serosaler und mukosaler Seite gemessen. Mit den Stromelektroden, die sich an der Rückseite der Kammern etwas weiter vom Gewebe entfernt befanden, konnte externer Strom eingeleitet werden.

Elektrophysiologische Parameter

Die Messung des elektrischen Stroms und der Potentialdifferenz erfolgte über eine computergesteuerte Voltage-Clamp Apparatur (Dipl.-Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen). Es wurden definierte Strompulse ausgesendet und der Abfall der Potentialdifferenz gemessen. Die Pulshöhe betrug dabei 50 μ S und die Pulsdauer 200 ms.

Vor dem Einspannen des Gewebes wurden zunächst die Eigenpotentialdifferenz (dPe) und der Eigenwiderstand (Rf) der Elektroden wie des Puffers für jede Kammer bestimmt.

Es gibt 3 verschiedene Messmethoden zur Erfassung oder Beeinflussung der verschiedenen Parameter, nämlich „Open Circuit“, „Short Circuit“ und „Voltage Clamp“, von denen für diese Arbeit nur die ersten beiden genutzt wurden.

Bei der Open Circuit Methode wird die Potentialdifferenz direkt gemessen. Es wird kein Strom von außen zur Gegenregulierung angelegt. Durch das Entsenden kurzer Stromimpulse wird eine kurzfristige Änderung der Potentialdifferenz ausgelöst. Mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes kann dann der Widerstand berechnet werden:

$$R_t = \Delta PD_t / \Delta I$$

In dieser Arbeit wurden alle Versuche mit der Open Circuit-Methode durchgeführt.

Die Potentialdifferenz entsteht durch elektrogene Ionenbewegungen über die Membran. Unter Kurzschlussbedingungen (short circuit) wird ein externer Strom entgegen gesetzt, welcher der Summe aller Ionenbewegungen äquivalent ist. Die Potentialdifferenz wird somit auf 0 gesetzt. Mit dieser Methode kann der elektrische Gradient ausgeschaltet werden. Die Short Circuit-Methode wurde in dieser Arbeit ausschließlich zur Durchführung des Glukosestimulationstests benutzt. Bei der Voltage Clamp-Methode wird die

Potentialdifferenz durch einen externen Strom auf Werte $\neq 0$ eingestellt. Diese Methode wurde für diese Arbeit nicht verwendet.

Transport Experimente

Nach dem Einspannen der Segmente in die Kammern wurden beide Kammerhälften mit 5 ml auf 37°C erwärmtem KBR gefüllt. Die Absorptionsfläche des Gewebes betrug 0,67 cm². Die Vitalität und die mechanische Unversehrtheit des Gewebes wurden ständig durch Monitoring des elektrischen Widerstandes (R) und der Potentialdifferenz (PD) kontrolliert. Gewebe mit PD-Werten unter 2 mV oder R-Werten unter 30 Ohm x cm² wurde verworfen. Darüber hinaus wurden stichprobenartig am Ende der Versuche Glukose-Stimulationstests durchgeführt. Dabei wurde auf der mukosalen Seite 20 mmol/l Glukose zugegeben. Durch die Zugabe musste sich der Kurzschlussstrom gegenüber dem basalen Wert um mehr als 30% erhöhen. Nach 30 Minuten Äquibrierzeit wurden die Experimente durch Entleeren der Kammern und Austausch der Lösungen auf beiden Seiten gestartet. Auf die apikale Seite wurde in einigen Reihen des Experiments eine Lösung eines Wirkstoffes eingefüllt. In anderen Reihen wurde der komplexierte Wirkstoff direkt auf die Membran gegeben und anschließend 5 ml KBR in die Kammer eingefüllt. Die basolaterale Seite wurde mit 5 ml KBR befüllt. Nach 30, 60, 90 und 120 Minuten wurden basolateral 600 µl Probe entnommen und unverzüglich durch frischen Puffer ersetzt. Nach den Experimenten wurden die Proben bis zur Analyse bei -18°C gelagert.

2.2.11. Analytische Methoden

Trospium und Butylscopolamin aus den Ussing-Kammer- und Caco-2-Versuchen

Die Konzentration beider Wirkstoffe wurde mittels HPLC untersucht. Dazu wurde ein isokratisches System und eine UV-Detektion bei 210 nm benutzt. Die mobile Phase bestand aus 300 ml Lösung von 0,03 M/l $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ in bidestilliertem Wasser, 700 ml Acetonitril und 1,5 ml Phosphorsäure 85%. Es wurde eine reversed-phase C-8 Säule benutzt (LiChroCart 125 x 4 mm, RP-8, Superspher 60, Merck, Darmstadt). Proben von 50 µl wurden injiziert. Für beide Analysen betrug die Laufzeit 7 Minuten bei einer Flussrate von 1,2 ml/min und Raumtemperatur. Das Detektionsminimum lag bei 100 ng/ml. Die Methode wurde für Trospium bereits in der Publikation von Grube und anderen beschrieben [23].

Atenolol aus den Ussing-Kammer-Versuchen

Die Atenolol-Konzentration wurde mittels HPLC bestimmt. Dazu wurde ein isokratisches System und UV Detektion bei 224 nm benutzt. Die mobile Phase bestand aus 30% Acetonitril und 70% eines Phosphat-Puffers, der aus 0,067 M/l $NaH_2PO_4 \times H_2O$ mit 0,2% Triethylamin bestand. Es wurde eine reversed-phase C-18 Säule benutzt (LiChrospher 100 RP-18e, 250 x 4 mm, 5 µm). Proben von 50 µl wurden injiziert. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min bei Raumtemperatur. Das Detektionsminimum lag bei 100 ng/ml.

Plasmaproben

Die Analytik der Trospiumchlorid-Plasmaproben erfolgte mittel LC/MS/MS. Dazu wurde ein Agilent 1100 HPLC System benutzt, das an ein API 3000 Massenspektrometer angeschlossen war. 50 µl Plasma wurden mit 100 µl Acetonitril präzipitiert. Die Proben wurden bei 3000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und mit der gleichen Menge an bidestilliertem Wasser für die Analyse gemischt.

Die Abtrennung von Trosipiumchlorid erfolgte mit einer Gradientenmethode. Die mobile Phase bestand aus einer Lösung von 5 mM/l Ammoniumacetat in bidestilliertem Wasser (A) und Acetonitril (B) in unterschiedlichen Mengen. Folgender Gradient wurde verwendet:

0-4.5 min	300 µl /min	10 % A	90 % B
4.5-6.3 min	300 µl /min	70 % A	30 % B
6.3-7.0 min	600 µl /min	50 % A	50 % B
7.0-7.1 min	300 µl /min	50 % A	50 % B
7.1-9.0 min	300 µl /min	10 % A	90 % B

Multiples Reaktions-Monitoring wurde mit den Übergängen Q_1/Q_3 : 392.207 \rightarrow 182.201 durchgeführt. Die Laufzeit betrug 9 Minuten. Das Injektionsvolumen betrug 5 µl. Die Retentionszeit betrug 0,5 Minuten. Das Detektionsminimum lag bei 1 ng/ml.

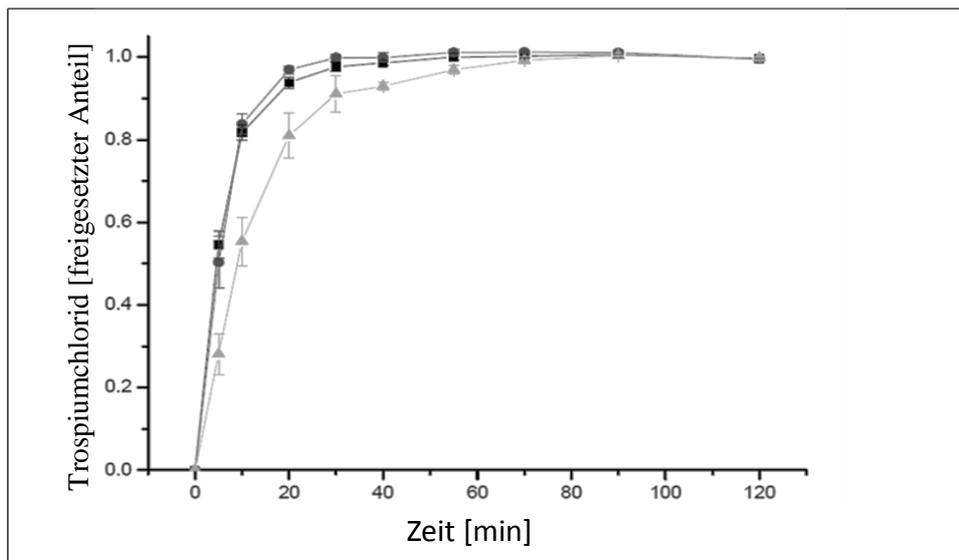
2.2.12. Statistische Methoden

Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test bei einer statistischen Sicherheit von 95% durchgeführt. P-Werte unterhalb von 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

2.3. Ergebnisse

2.3.1. Charakterisierung der Komplexe

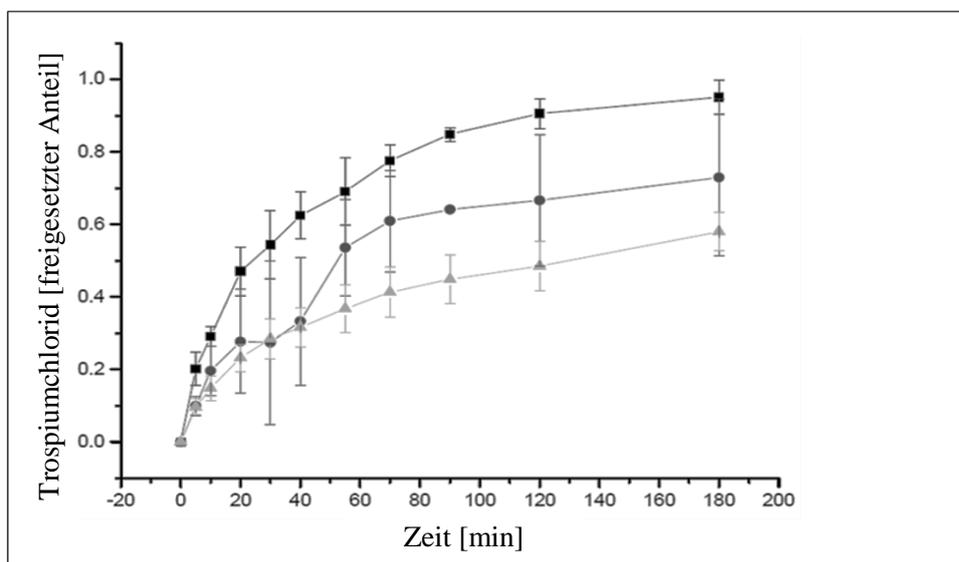
Bei der Untersuchung der Freisetzungprofile der Spasmolyt-Formulierung aus Hartgelatinekapiteln war nur ein geringer Einfluss des pH-Wertes zu erkennen. Bei pH 1, pH 4,5 und pH 6,8 waren nach 30 Minuten über 80% des Wirkstoffes freigesetzt. Die Freisetzungprofile bei pH 1 und pH 4,5 waren dabei weitgehend identisch, während der Wirkstoff bei pH 6,8 etwas langsamer freigesetzt wurde. Die Ergebnisse sind in Figur 2.1 dargestellt.



Figur 2.1. Mittlere Freisetzungprofile von 100 mg zerkleinertem Spasmolyt aus Hartgelatinekapiteln der Größe 000 bei pH 1 (■), pH 4,6 (●) und pH 6,8 (▲). Der Graph stellt die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 5 Messungen dar.

Bei der Untersuchung der Freisetzungprofile des Komplexes aus Hartgelatinekapiteln waren bei pH 1 nach 30 Minuten ca. 50% des Trospiums freigesetzt, nach 180 Minuten waren etwa 90% freigesetzt. Bei pH 4,6 waren nach 30 Minuten erst ungefähr 25% des Trospiums

freigesetzt, nach 180 Minuten waren erst ca. 79% freigesetzt. Bei der Untersuchung der Freisetzung bei pH 6,8 waren nach 30 Minuten nur 25% des Wirkstoffes gelöst. Nach 180 Minuten waren nur 50% gelöst. Die Freisetzungsprofile des Trosipium- λ -Carrageen-Komplexes aus Hartgelatinekapseln zeigten im Gegensatz zu Spasmolyt also eine deutlich ausgeprägte pH-Abhängigkeit. Außerdem waren, vor allem bei den Freisetzungskurven bei pH 4,6 und pH 6,8, wesentlich höhere Standardabweichungen zwischen den einzelnen Messungen zu beobachten. Die Freisetzungskurven des Komplexes werden in Figur 2.2 gezeigt.

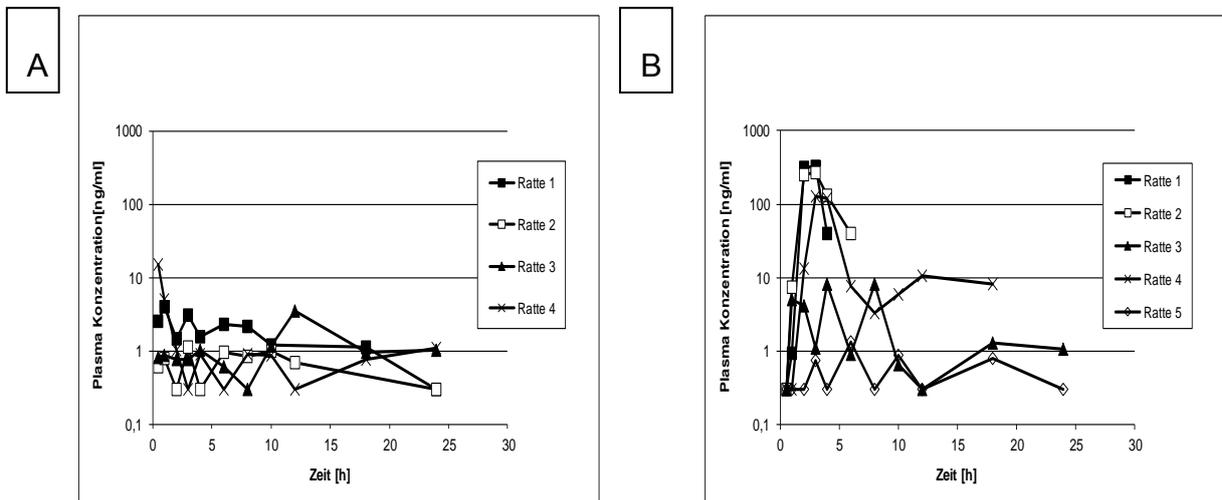


Figur 2.2. Mittlere Freisetzungsprofile von 117,2 mg Trosipium- λ -Carrageen-Komplex aus Hartgelatinekapseln der Größe 000 bei pH 1 (■), pH 4,6 (●) und pH 6,8 (▲). Der Graph stellt die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 5 Messungen dar.

2.3.2. In-vivo-Studien

Ratten wurden magensaftresistente Kapseln mit Trosipium in Form von zerkleinerten Spasmolyt-Tabletten und mit Trosipium in Form von Trosipium- λ -Carrageen-Komplex verabreicht. In allen Fällen war die beobachtete Plasma-Konzentration von Trosipium hoch

variabel. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit früheren Studien, die an Ratte und Mensch durchgeführt wurden. Nach Verabreichung von Kapseln mit zerkleinertem Spasmolyt waren maximal Werte von 10 ng/ml zu beobachten. Nach Verabreichung von Kapseln mit Trosipium- λ -Carrageen-Komplex zeigten 3 von 5 Ratten eine starke Erhöhung der Plasma-Konzentration, während bei 2 Ratten keine signifikanten Änderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten waren. Die maximalen Plasma-Konzentrationen bei den Ratten, bei denen ein Effekt sichtbar war, lagen bei ca. 500 ng/ml. Dieser Wert liegt fast um Faktor 50 höher als in der Kontrollgruppe. Die Ratten 1,2 und 4 starben vor Beendigung des Experimentes. Die Ergebnisse der in-vivo-Studien sind in Figur 2.3 dargestellt.

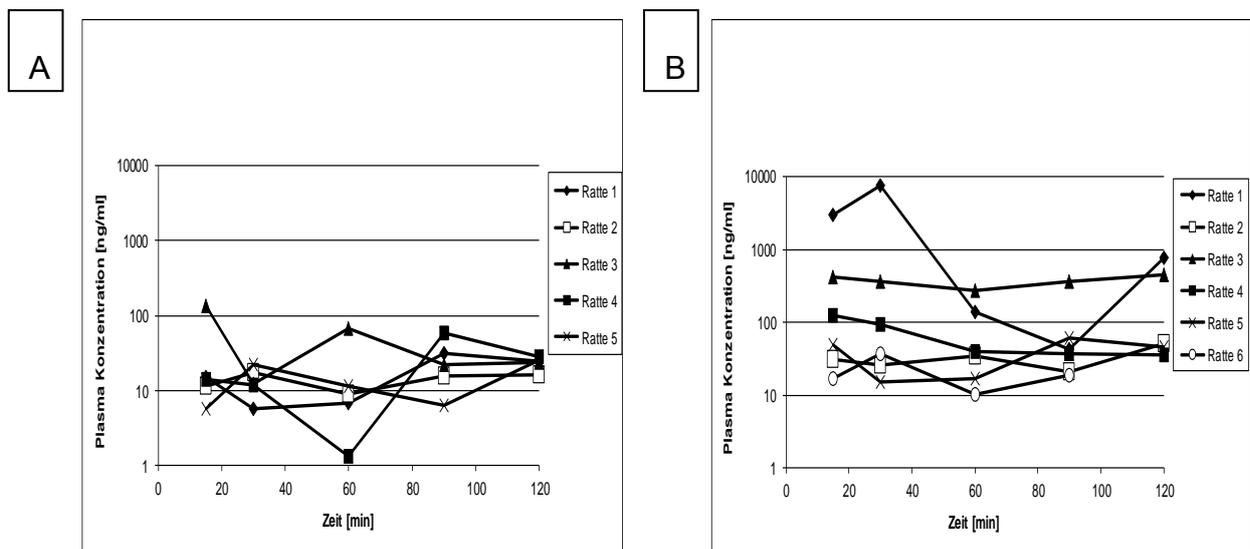


Figur 2.3. Trosipium-Plasmakonzentrationen bei Ratten nach peroraler Applikation von zwei magensaftresistenten Hartgelatine-kapseln mit je 0,75 mg Trosipium in Form von zerkleinertem Spasmolyt (A) und nach peroraler Applikation von zwei magensaftresistenten Hartgelatine-kapseln mit je 0,75 mg Trosipium in Form von Trosipium- λ -Carrageen-Komplex (B) durch Schlundsondierung. Der Trosipiumkomplex bestand aus 64% Trosipium und 36% λ -Carrageen.

2.3.3. Ligated-Loop-Studien

Die Ergebnisse der Ligated-Loop-Studien sind denen der in-vivo-Studie sehr ähnlich. Auch hier zeigen alle Plasmakonzentrationen eine hohe Variabilität. Bei 4 von 6 Ratten, denen

Trospium- λ -Carrageen-Komplex verabreicht wurde, ist keine signifikant erhöhte Absorption des Wirkstoffes zu beobachten, während bei 2 Ratten ein deutlicher Effekt sichtbar ist. Nach 15 Minuten ist die Plasma-Konzentration einer der Ratten im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollgruppe um Faktor 80 erhöht. Bei einer anderen Ratte ist der Wert nach 15 Minuten im Vergleich zur Kontrollgruppe um Faktor 10 erhöht. Die Ergebnisse der Ligated-Loop-Studien werden in Figur 2.4 gezeigt.

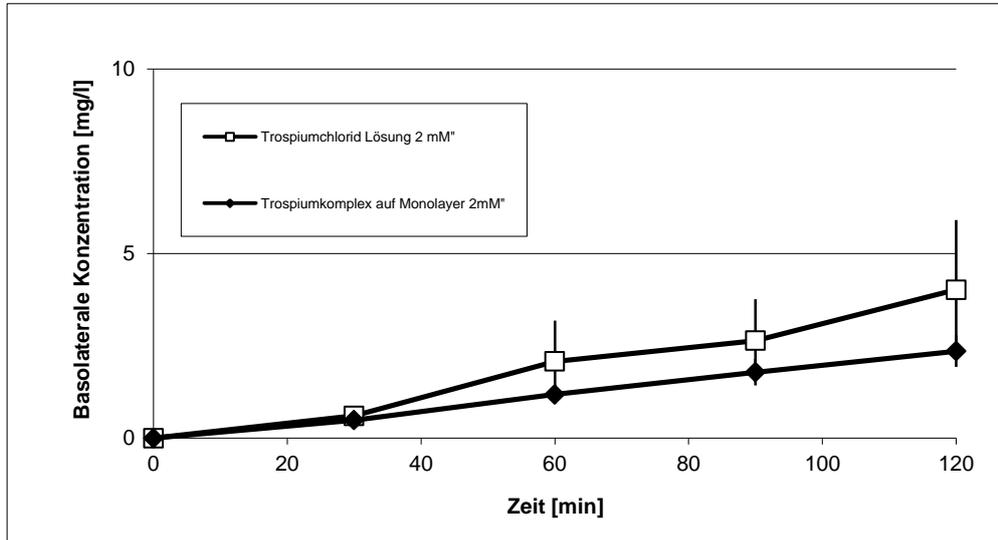


Figur 2.4. Plasmakonzentrationen bei Ratten nach intrajejunaler Applikation von 3 mg Trospium in Form einer Trospiumchloridlösung (A) und Applikation von 3 mg Trospium in Form von Trospium- λ -Carrageen-Komplex (B) im Rahmen einer Ligated-Loop-Studie. Der Trospiumkomplex bestand aus 64% Trospium und 36% λ -Carrageen.

2.3.4. Caco-2-Transport-Experimente

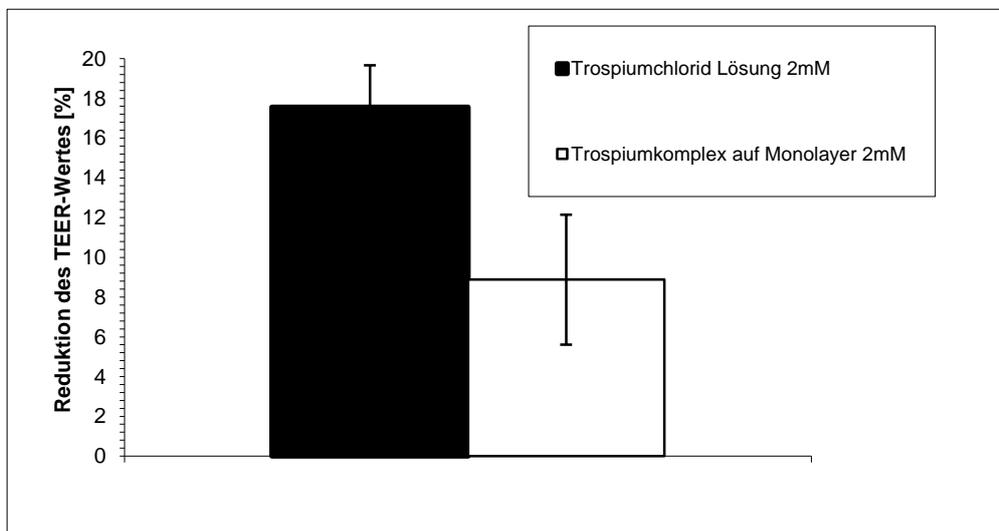
Es wurde untersucht, ob durch λ -Carrageen eine Verbesserung der Permeation von Trospium über Caco-2-Zellen erreicht werden kann. Die Ergebnisse der Permeationsversuche sind in Figur 2.5 dargestellt. Der Graph zeigt, dass der Flux im Vergleich zur Trospium-Lösung bei

Verwendung des Komplexes leicht abgenommen hat. Die Unterschiede erreichten keine statistische Signifikanz.



Figur 2.5. Vergleich der apikalen nach basolateralen Permeation einer 2 mM Lösung von Trosipiumchlorid (\square) und der gleichen Menge Trosipium in Form von Trosipium- λ -Carrageen-Komplex (\blacklozenge), welches direkt auf die Membran gegeben wurde, über einen Caco-2-Monolayer, der Trosipiumkomplex bestand aus 64% Trosipium und 36% λ -Carrageen.

Der transepitheliale Widerstand (TEER) wurde vor Beginn und nach Beendigung des Experimentes gemessen und die prozentuale Abnahme wurde ausgerechnet. Der TEER-Wert reduzierte sich um 17,6%, wenn eine Trospiumlösung verwendet wurde. Die gleiche Menge an Trospium als Komplex auf die Membran gegeben, führte nur zu einer Verringerung des TEER Wertes um 8,9%. Die Ergebnisse werden in Figur 2.6 gezeigt.



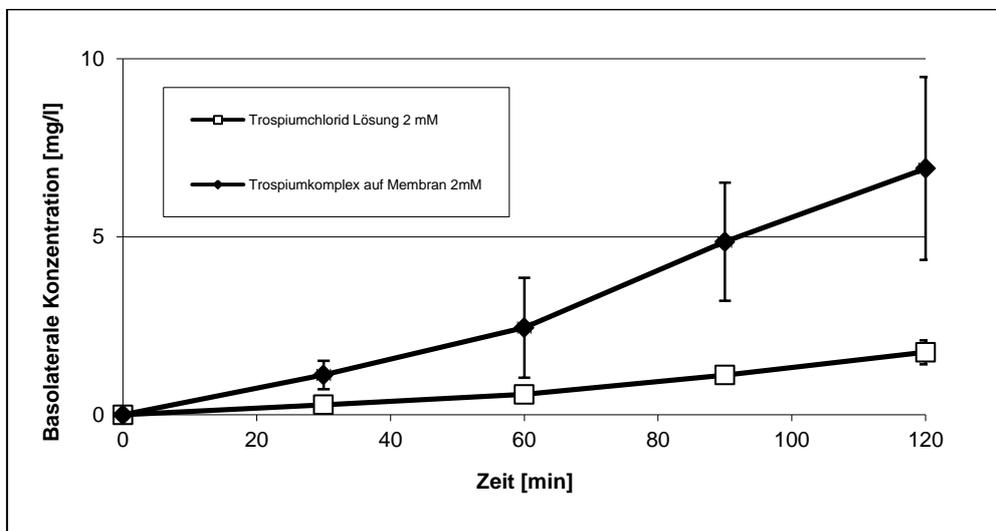
Figur 2.6. Reduktion des TEER-Wertes eines Caco-2-Monolayers nach 2 h durch eine 2 mM Lösung von Trospiumchlorid (gestreift), bzw. Minderung durch die gleiche Menge Trospium in Form von direkt auf die Membran gegebenem Trospium- λ -Carrageen-Komplex, der Trospiumkomplex bestand aus 64% Trospium und 36% λ -Carrageen.

2.3.5. Transport Experimente mit Rattenjejunum an der Ussing-Kammer

Mit Hilfe des Caco-2-Modells konnte kein signifikanter Effekt von λ -Carrageen auf die Permeation von Trospium festgestellt werden. Die Unwirksamkeit von λ -Carrageen im Caco-

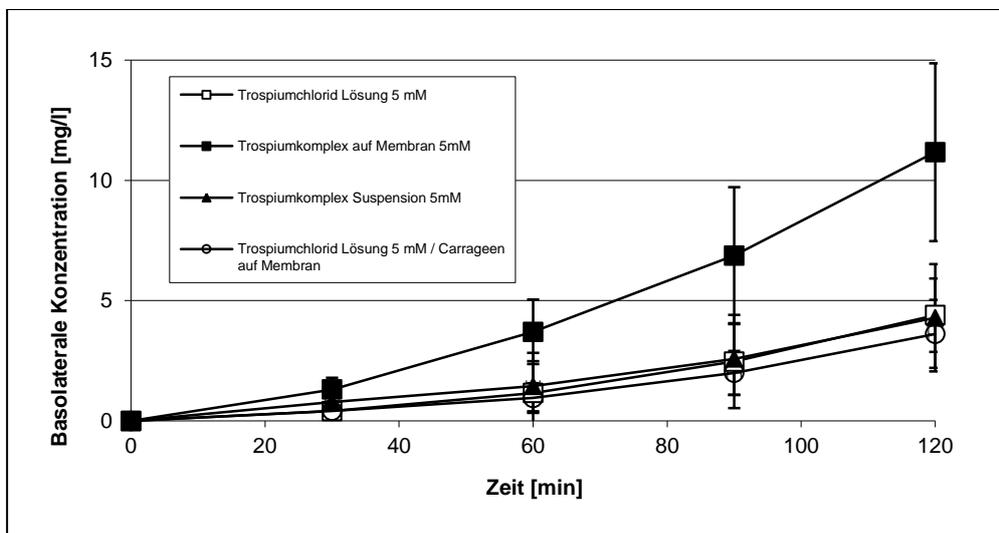
2-Modell hängt unter Umständen mit der Tatsache zusammen, dass Caco-2-Zellen keinen Mukus bilden. Es wurde daher Mukus produzierendes Rattenjejenum als zusätzliches Modell für weitere Untersuchungen verwendet. Ergebnisse, die mit diesem Modell ermittelt wurden, lassen in den meisten Fällen eine relativ akkurate Vorhersage der Permeabilität im Menschen zu [274].

Figur 2.7 zeigt den Vergleich der Permeation einer 2 mM Lösung von Trosipiumchlorid und 2 mM direkt auf der Mukosa aufgebrachtem Trosipiumkomplex. Bei Verwendung der Lösung beträgt die Trosipium-Konzentration im Akzeptor-Kompartiment nach 2 Stunden 1,75 mg/l. Bei Verwendung des Komplexes kann man nach 2 Stunden eine Trosipium-Konzentration von 6,92 mg/l im Akzeptor-Kompartiment finden. Im Gegensatz zu den mit dem Caco-2-Modell ermittelten Ergebnissen zeigen diese Daten eine deutliche, signifikante Wirkung von λ -Carrageen auf die Trosipium-Konzentration.



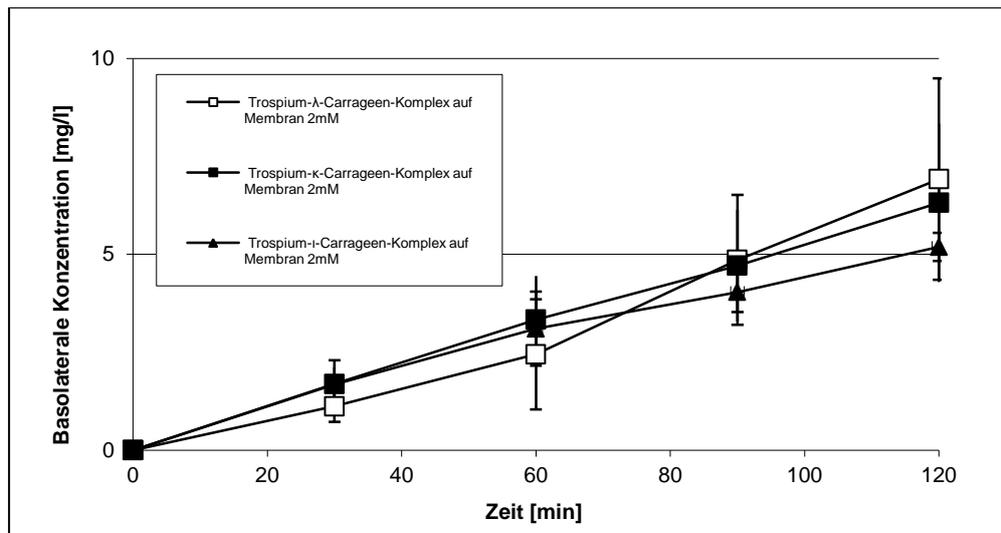
Figur 2.7. Vergleich der apikalen nach basolateralen Permeation einer 2 mM Lösung von Trosipiumchlorid (\square) und der gleichen Menge Trosipium in Form von Trosipium- λ -Carrageen-Komplex (\blacklozenge), welches direkt auf die Membran gegeben wurde, über in einer Ussing-Kammer eingespanntes Rattenjejenum, der Trosipiumkomplex bestand aus 64% Trosipium und 36% λ -Carrageen.

Bei Verwendung von 2 mM Lösung bzw. Komplex ist die Konzentration im Akzeptor-Medium nach 2 Stunden um Faktor 4 erhöht. Wenn stattdessen 5 mM Lösung oder Komplex verwendet werden, ist die Konzentration nach Komplex-Applikation nur um etwas mehr als Faktor 2 erhöht. Komplex-Partikel, die in die Donor Kammer suspendiert und nicht direkt auf die Membran aufgebracht werden, führen zu keiner signifikanten Veränderung der Permeabilität. Wenn reines λ -Carrageen auf die Membran aufgebracht wird, führt dies ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der Trospium Permeation. Diese Daten sind in Figur 2.8 dargestellt.



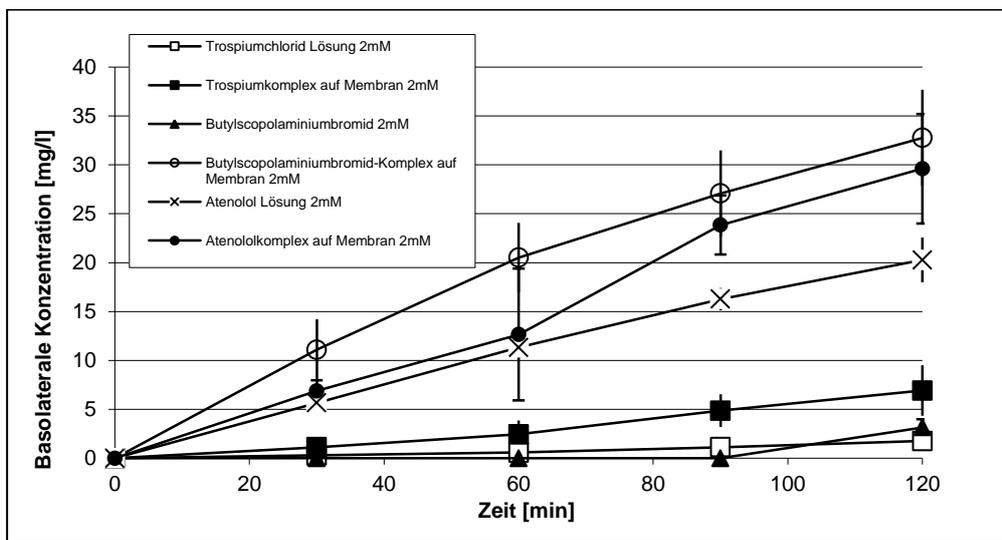
Figur 2.8. Vergleich der apikalen nach basolateralen Permeation von 5 mM Trospium als Trospiumchloridlösung (\square), als direkt auf der Membran appliziertem Trospium- λ -Carrageen-Komplex (\blacksquare), als Trospium- λ -Carrageen-Komplex Suspension (\blacktriangle), und als Trospiumchloridlösung bei gleichzeitiger Gabe von λ -Carrageen auf die Membran (\circ) über in einer Ussing-Kammer eingespanntes Rattenjejunum, der Trospiumkomplex bestand aus 64% Trospium und 36% λ -Carrageen.

Um den Effekt, der durch λ -Carrageen erreicht werden kann, mit dem Effekt anderer Carrageen-Arten zu vergleichen, wurden Komplex mit κ - und ι -Carrageen hergestellt. Wie in Figur 2.9 gesehen werden kann, führten κ - und ι -Carrageen zu einer Erhöhung der Trosipium Permeation, welche den durch λ -Carrageen erreichten Werten ähnlich ist.



Figur 2.9. Vergleich der apikalen nach basolateralen Permeation von 2 mM verschiedener Trosipiumkomplexe über in einer Ussing-Kammer eingespanntes Rattenjejunum. Als Polymere wurden λ -Carrageen (\square), κ -Carrageen (\blacksquare) und ι -Carrageen (\blacktriangle) verwendet, die Komplexe bestanden aus 64% Trosipium und 36% des jeweiligen Carrageens.

Um zu untersuchen, ob es gelingt, die in-vitro-Ergebnisse, die für Trospium erzielt werden konnten, auch mit anderen Substanzen zu erreichen, wurden λ -Carrageen Komplexe von Atenolol und Butylscopolamin hergestellt. Wie in Figur 2.10 gesehen werden kann, führte die Komplexierung aller Substanzen zu einer Verbesserung der Permeabilität. Die Permeabilitätsverbesserung von Atenolol (ca. Faktor 1,5) war dabei im Vergleich zu Trospium (ca. Faktor 4) und Butylscopolamin (ca. Faktor 10) relativ gering.



Figur 2.10. Vergleich der apikalen nach basolateralen Permeation einer 2mM Lösung von Trospium (\square), 2mM Trospium in Form von Trospium- λ -Carrageen-Komplex (\blacksquare), einer 2mM Lösung von Atenolol (X), 2 mM Atenolol in Form von Atenolol- λ -Carrageen-Komplex (\bullet), einer 2mM Lösung von Buscopan (\blacktriangle) und Buscopan in Form von Buscopan- λ -Carrageen-Komplex (\circ), die Komplexe bestanden aus 64% Wirkstoff und 36% λ -Carrageen und wurden immer direkt auf der Membran appliziert.

2.4. Diskussion und Fazit

Viele Gruppen haben bereits versucht verschiedene Carrageen-Arten zur Verbesserung der oralen Pharmakotherapie zu nutzen. Carrageene fanden beispielsweise in Formulierungen mit verzögerter oder veränderter Wirkstofffreisetzung Verwendung [278]. Die Eigenschaften von Kapseln, die Carrageen als Teil der Hülle enthalten, wurden als Alternative zu Gelatinekapseln ebenfalls untersucht [279]. Die Nutzung von Carrageen in Arzneimittelsystemen mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung wurde auch diskutiert [280]. Es wurde bereits versucht, Carrageen als Permeationsverbesserer in nasalen, vaginalen, bukkalen oder ophthalmischen Formulierungen einzusetzen. Es wurde jedoch nie versucht, einen permeationserhöhenden Effekt mit Hilfe von Carrageen in Formulierungen für die perorale Anwendung zu erreichen. Einige Gruppen haben allerdings bereits Versuche unternommen, andere mukoadhäsive Substanzen zur Erhöhung der der Absorption nach oraler Applikation zu nutzen. Toorisaka und andere haben beispielweise den Nutzen von intestinalen Patches, die verschiedene mukoadhesive Polymere enthielten, für die orale Applikation von Proteinen mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik untersucht [281].

In der aktuellen Studie wurde die Interaktion des anionischen Polymers λ -Carrageen mit einem kationischen Wirkstoff im Hinblick auf mögliche Modulationen der intestinalen Permeabilität des aktiven Wirkstoffes in vitro und in vivo untersucht.

Für die in-vivo-Studien wurden magensaftresistente Kapseln mit einem Überzug aus Eudragit L verwendet, da die Freisetzung des Komplexes im Gegensatz zur Freisetzung von Spasmolyt eine wesentlich stärkere pH-Abhängigkeit aufwies. Sowohl in den in vivo, als auch in den in-situ-Studien wurden bei den Gruppen, die Carrageen haltige Formulierungen erhielten, im Vergleich zu den Kontrollgruppen sehr hohe Standardabweichungen festgestellt. Die Ratten 1,2 und 4 starben vor dem Ende der in-vivo-Studien, höchstwahrscheinlich aufgrund einer Überdosis an Trosipiumchlorid.

Es wurden mechanistische Studien zur Permeabilität der Trosipiumchlorid-Lösung und des Polyelektrolytkomplexes über Caco-2-Monolayer und in einer Ussing-Kammer eingespannte Segmente von Rattenjejunum durchgeführt. Die Daten zeigen, dass die Verwendung des

Komplexes zu keiner Verbesserung der Permeabilität im Caco-2-Modell führte. Eine mögliche Erklärung stellt das Fehlen von Mukus im Caco-2-Modell dar. Dies könnte dazu führen, dass es nicht zur Adhäsion und zum engen Kontakt der Partikel mit dem Epithel des Zellmonolayers kommt. Die Permeabilität des Komplexes war bei diesen Versuchen niedriger als die Permeabilität der Kontrolle, vermutlich aufgrund der langsameren Freisetzung des Komplexes und des damit verbundenen kleineren freien Anteils an permeablem Trosipium.

Ein interessanter Gesichtspunkt war die signifikant niedrigere Reduktion des TEER-Wertes bei Verwendung des Komplexes. Eine mögliche Schlussfolgerung ist, dass der Komplex zellprotektive Eigenschaften besitzt, während viele andere Substanzen mit permeationsverbessernden Eigenschaften signifikante Schäden am Monolayer verursachen [282, 283]. Eine andere mögliche Schlussfolgerung lautet, dass der zellschädigende Effekt von Trosipium durch Erniedrigung des freien Anteils reduziert werden kann.

Im Ussing-Kammer-Modell konnte die Permeation einer 2 mM Lösung von Trosipium über isoliertes Rattenjejenum durch Verwendung von Komplex um Faktor 4 erhöht werden. Anscheinend ist die Anwesenheit von Mukus eine Voraussetzung für den beobachteten Effekt. Wenn anstelle einer 2 mM Lösung eine 5 mM Lösung von Trosipium verwendet wurde, erhöhte sich, wie man es erwarten würde, die Konzentration im Akzeptor-Medium nach 2 h um Faktor 2,5. Wenn die gleichen Mengen Trosipium als Komplex eingesetzt wurden, erhöhte sich die Menge an permeiertem Trosipium nur um Faktor 1,6. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Permeationsverbesserung durch Carrageen ein Maximum erreicht, wenn eine gegebene Membranoberfläche mit Komplex bedeckt ist und dass eine weitere Absorptionsverbesserung nur möglich ist, wenn eine größere Oberfläche verfügbar wird.

Es kam zu keiner verbesserten Permeation, wenn eine Suspension des Komplexes appliziert wurde, was darauf hindeutet, dass vorherige Hydrierung des Komplexes eine starke Interaktion des Komplexes mit Mukus unterbindet und zu einer verringerten Permeationsverbesserung führt. Es kann angenommen werden, dass es eines engen Kontaktes des Komplexes mit der Membran bedarf, um den Effekt zu erzeugen. Das Aufbringen von reinem Carrageen auf die Membran führte ebenfalls zu keiner verbesserten Permeation. Es beeinflusst die Permeabilität offensichtlich nur dann, wenn eine dichte Verbindung mit dem

Wirkstoff vorliegt. Der Effekt wird also nicht durch Veränderungen an tight junctions erzeugt und führt nicht zu einer verstärkten Permeation von Toxinen und anderen Fremdstoffen, die nicht direkt mit dem Polymer verbunden sind. Die geringere Reduktion des TEER-Wertes bei Caco-2-Zellen führt zu der gleichen Schlussfolgerung.

Die starken Standardabweichungen der Plasmaspiegel, die bei den in-vivo- und in-situ-Experimenten beobachtet wurden, können demzufolge dadurch erklärt werden, dass es in vivo oder in situ nicht zu einer reproduzierbaren Bedeckung der Membran mit nicht bereits vorher hydratisiertem Komplex kommt.

Eine generelle Verbesserung der intestinalen Permeabilität durch Carrageene als Hilfsstoffe kann also ausgeschlossen werden. Wenn ein Komplex zwischen einem kationischen Hilfsstoff und dem anionischen Polymer hergestellt wird, kann die starke Interaktion des Polymers mit der Membran durch den höheren Konzentrationsgradienten, der an der Membran aufgebaut wird, jedoch zur verbesserten Permeation einer üblicherweise schwerpermeablen BCS Klasse III Substanz führen. Unsere Daten lassen die Vermutung zu, dass der Effekt umso größer ausfällt, je schlechter die Permeabilität der entsprechenden Wirkstofflösung ist. Um dieses Phänomen für pharmazeutische Zubereitungen zu nutzen, müssen jedoch einige Schwierigkeiten überwunden werden. Es muss ein Weg gefunden werden, die vorherige Hydrierung des Komplexes zu verhindern und eine gleichmäßige Verteilung des Komplexes auf der zu Membranoberfläche zu erreichen.

3. Ionenpaarbildung mit Gallensalzen verändert die intestinale Permeabilität und erklärt die Nahrungsmittelinteraktion der BCS Klasse III Substanz Trospiumchlorid

3.1. Einleitung

Nahrung kann die Aufnahme von Wirkstoffen auf unterschiedliche Arten beeinflussen. Die Aufnahme von Nahrung führt zu einem veränderten pH-Wert des Magens und zu einer verlangsamten Magenentleerung. Die Bindung von Wirkstoffen an Nahrungsbestandteile kann zu veränderten physikochemischen Eigenschaften führen. Die Inhibition von Transportern durch Nahrungsbestandteile wurde ebenfalls beschrieben [214, 284-287].

Es wurden beachtliche Anstrengungen unternommen, um den Einfluss der Nahrungsaufnahme für bestimmte Wirkstoffe vorherzusagen [288, 289]. Einige Wissenschaftler haben versucht, eine Vorhersage des Einflusses von Nahrung auf Grundlage des biopharmazeutischen Klassifizierungssystems (BCS) zu treffen. Es wurde festgestellt, dass die meisten BCS Klasse II Substanzen nach Nahrungsaufnahme eine erhöhte Bioverfügbarkeit aufgrund von besserer Löslichkeit in vivo zeigten, während die meisten BCS Klasse III Substanzen eine verringerte Bioverfügbarkeit aufwiesen. Bei einem Großteil der BCS Klasse I Substanzen war keine Veränderung der Bioverfügbarkeit durch gleichzeitige Nahrungsaufnahme feststellbar [284, 290].

Trospiumchlorid, eine quartäre Ammoniumverbindung, die seit Langem zur Behandlung einer überaktiven Blase eingesetzt wird, stellt einen typischen Vertreter für eine BCS Klasse III Substanz dar. Es zeigt eine niedrige Permeabilität in vitro und in vivo und hat nach oraler Einnahme nur eine Bioverfügbarkeit von etwa 10 %. Wenn es zusammen mit Nahrung eingenommen wird, kommt es zu einer weiteren Senkung der Bioverfügbarkeit um mehr als 80 % [11, 269, 291].

Bisher gab es nur wenig Forschungsarbeit, mit der versucht worden ist, den zugrunde liegenden Mechanismus des negativen Food-Effektes von Trospiumchlorid und anderen quartären Ammoniumverbindungen aufzuklären. Radwan und andere [12] haben demonstriert, dass die erhöhte Viskosität des Mageninhaltes nach Nahrungsaufnahme zu einem verzögerten Zerfall von Arzneiformen mit schneller Wirkstofffreisetzung führt, was besonders für Substanzen mit kleinem Absorptionsfenster im oberen Dünndarmbereich, wie beispielsweise Trospiumchlorid von Relevanz ist. Allerdings haben die Autoren auch festgestellt, dass die erhöhte Zerfallszeit und die langsamere Freisetzung nicht vollständig das Ausmaß der Reduktion der Absorption nach Nahrungsaufnahme, die in vivo im Menschen beobachtet wurde, erklären können. Es müssen also noch weitere Mechanismen involviert sein.

Der Effekt von Gallensalzen, die im postprandialen Zustand (15 mM) in höherer Konzentration im Dünndarm vorliegen als im nüchternen Zustand (3 mM), wurde ebenfalls untersucht. In Gegenwart von Gallensalzen wurde eine erhöhte Löslichkeit lipophiler Wirkstoffe, also Substanzen der BCS Klasse II, festgestellt [292, 293]. Es konnte auch gezeigt werden, dass Interaktionen zwischen Wirkstoffen und Gallensalzen bzw. Proteasen zu einer verringerten effektiven Permeabilität führen können. Die verringerte Permeabilität kann aufgrund einer reduzierten Fraktion an freiem Wirkstoff oder einer verringerten Diffusion der ungerührten Wasserschicht zustande kommen [294-297].

Yang und andere haben den Einfluss von 4 verschiedenen Gallensalzen auf die Akkumulation von Rhodamin 123 (R123) in Endothelzellen des Rattenhirns (RBE4) untersucht. Sie zeigten, dass R123 mit Gallensalzen Ionenpaare bildet, welche die Verteilung in Liposomen beeinflussten und zu Veränderungen in der Fließfähigkeit der Membran führten. Alle Gallensalze führten konzentrationsabhängig zu einer vermehrten Aufnahme von R123. Den größten Einfluss hatte dabei Monoketocholat. Da Monoketocholat auch eine Verringerung des Efflux bewirkte, wurde eine Inhibition von P-Glykoprotein angenommen [298].

Song und andere konnten zeigen, dass die Ionenpaar-Komplexierung (IPC) organischer Kationen mit hepatischen Gallensalzen zu deren biliärer Exkretion beiträgt [13, 299]. Das Ausmaß der IPC unterschied sich beim Einsatz verschiedener Gallensalze bzw. beim Einsatz

von Substraten mit unterschiedlicher Molekülgröße. Tributylmethylammonium (TBuMA) bildete in großem Ausmaß Ionenpaare mit Gallensalzen, während Triethylmethylammonium dies nicht bewirkte. Song und andere postulierten, dass es einen Grenzwert im Molekulargewicht des Substrates gibt, unterhalb dem keine IPC vorkommt [299]. Diese Resultate stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Choi und anderen, die zeigen konnten dass eine reduzierte Galle-Produktion in Ratten zu einer verringerten biliären Exkretion von TBuMA führt [300]. Chae und andere konnten demonstrieren, dass der apparente Verteilungskoeffizient von Berberin zwischen n-Octanol und Phosphatpuffer in Gegenwart von TDOC anstieg. Der Transport von Berberin in basolateraler nach apikaler Richtung über Caco-2 bzw. LLC-PK1 Zellen wurde jedoch nicht verändert. Die Schlussfolgerung der Autoren lautete, dass der Effekt der IPC auf den Transport von den molekularen Eigenschaften des Substrats und den Charakteristika der Zelllinie abhängt [301].

Da es sich bei Trospiumchlorid um eine quartäre Ammoniumverbindung handelt, die große strukturelle Ähnlichkeit mit den von Song und anderen untersuchten Substanzen aufweist, ist als wahrscheinlich anzunehmen, dass auch Trospiumchlorid Ionenpaare mit Gallensalzen bildet. Verschiedene Konzentrationen von Gallensalzen im nüchternen und postprandialen Zustand könnten zu unterschiedlich starker IPC und dadurch zu einer unterschiedlichen Permeabilität von Trospium führen [302]. Ein solcher Effekt könnte auch auf andere organische Kationen übertragbar sein, welche einen negativen Food-Effekt zeigen, wie beispielsweise Atenolol, Metformin oder Verapamil.

In dieser Studie wird bewiesen, dass die IPC von Trospium mit Gallensalzen zu einer Veränderung der physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffes führt. Wir benutzten das Caco-2- und das Ussing-Kammer-Modell, um Unterschiede in der Permeabilität von Trospium in Gegenwart von Gallensalzen zu untersuchen. Dadurch sollte eine mögliche Involvierung der IPC in die Wirkstoff-Nahrungsmittel-Interaktion von BCS Klasse III Substanzen gezeigt werden.

3.2. Material und Methoden

3.2.1. Materialien

Die Ratten stammten von Charles River in Sulzfeld. GCDC wurde von Fluka erworben. Der VetspecTM Gallensäuren-Satz stammte von Catachem in Connecticut. Die Caco-2-Zellen stammten aus der European Collection of Cell Cultures. DMEM, HBSS und Penicillin/Streptomycin wurden bei Gibco gekauft. Ketamin (Ketavet, Pfizer) und Xylazin (Rompun, Bayer) wurden von der Apotheke der Universitätsklinik Mainz bezogen. Trosipiumchlorid war ein Geschenk der K.H.S. Pharma Holding GmbH in Ingelheim. Die Polycarbonat Transwells stammten von Corning in Amsterdam. ³H-Trosipium war ein Geschenk der Dr.R.Pfleger Chemische Fabrik GmbH in Bamberg. Alle anderen Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich in Schnelldorf erworben.

3.2.2. Enzymatischer Gallensalz-Nachweis

Das Prinzip der Prüfung basiert auf einem Verfahren, das von Mashige und anderen etabliert wurde [303]. Bei diesem Verfahren werden 3 α -Hydroxy-Gallensäuren in Gegenwart von 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen in die entsprechenden 3-ketohydroxy-Gallensäuren umgewandelt. Dies geschieht bei gleichzeitiger Reduktion von NAD⁺ zu NADH. Das entstandene NADH wird anschließend in einer durch Diaphorase katalysierten Reaktion wieder zu NAD⁺ oxidiert, bei der Nitrotetrazoliumblau zu einem Formazan-Farbstoff reduziert wird, der ein Absorptionsmaximum bei 540 nm besitzt. Die Absorption einer Lösung bei dieser Wellenlänge ist dann direkt proportional zur Konzentration an Gallensäuren in der Probe. Der VetspecTM –Satz besteht aus 2 Reagenzien, die schrittweise zu der Probe hinzugegeben werden. Darüber hinaus enthält der Satz eine Kalibrierlösung bekannter Konzentration als Referenz. Zur Analyse wurden eine 96-well Platte und ein TECAN-Fluoreszenzspektrofluorimeter benutzt. Die Absorptionsmessungen wurden bei 535 nm durchgeführt. Die Gallenextrakte wurden in Wasser in einer Konzentration von 100 μ g/ml

gelöst. Die Konzentration der benutzten Kalibrierlösung betrug 100 µmol/ml. Die Gallensäurenkonzentration wurde folgendermaßen errechnet:

Gallensäuren (µmol/ml) = (Δ Abs. Probe) / (Δ Abs. Kalibrierlösung) x Konz. Kalibrierlösung,

wobei Δ Abs. die Differenz der Absorption der Probe oder der Kalibrierlösung und des Blanks darstellt.

3.2.3. ¹H-NMR

Die Proben wurden durch Mischen von Gallenextrakt (34-43 mg) und des internen Standards Methyl-Dichloracetat (90-100 mg) in 5 ml DMSO-d₆ vorbereitet. 900 µl des gelösten Gallenextraktes und 100 µl der internen Referenzlösung wurden dann mittels Vortex gemischt. Die Proben wurden bei 7500 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert. Danach wurden 700 µl in ein NMR Gefäß pipettiert. In DMSO sind die Signale der Taurin- und Glycin-Konjugate gut getrennt (7,66 und 7,16 ppm). Methyl-Dichloracetat erscheint bei 6,9 ppm. Die NMR Messungen wurden 60-90 Minuten nach der Vorbereitung durchgeführt. Die Messungen wurden an einem Bruker AV400 NMR Spektrometer mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Frequenz: 400 MHz

Scans: 120

Relaxation delay: 4 Sekunden

Erfassungszeit: 2,5 Sekunden

Impuls-Winkel: 30°

Sweeping-Bereich: 16 ppm

Auflösung: 0,2 Hz

Größe: 32K

Die Daten wurden mittels ACD/SpecManager (ACD/Labs Release 9.00) analysiert.

3.2.4. Isothermale Titrationskalorimetrie

Die Experimente wurden mit Taurochenodesoxychololat (TCDC) und Glycochenodesoxychololat (GCDC) in 10 mM Phosphatpuffer bei pH 6,5 mit und ohne Zusatz von 0,1 M NaCl bei 37°C durchgeführt. Die Versuche wurden mit einer variablen Konzentration isothermaler Titrations Kalorimetrie (VP-ITC) durchgeführt (Microcal, Großbritannien). Der Titrand (GCDC oder TCDC) wurde in einer Konzentration von 5 mM und der Titrator (Trospiumchlorid) in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt. Die Injektionen wurden folgendermaßen durchgeführt:

-28 Injektionen, 1 x 1,5 µl, 27 x 10 µl, 5 Minuten Pause zwischen 2 aufeinander folgenden Injektionen für die Experimente ohne Salz

-54 Injektionen, 1 x 1,5 µl, 53 x 5 µl, 5 Minuten Pause zwischen 2 aufeinander folgenden Injektionen für die Experimente mit Salz

Es wurden Verdünnungsexperimente mit 10 mM Phosphatpuffer mit pH 6,5 durchgeführt und die Verdünnungswärme von der Wärme, die in den Experimenten mit Ligand ermittelt wurde, abgezogen. Die Datenanalyse erfolgte durch Bindungsmodelle für eine Bindungsart, für zwei Bindungsarten und sequentiellem Bindungsmodell. Das Fitting der Kurven erfolgte mit der Origin7 Software (OriginLab). Die genauen mathematischen Hintergründe der Methode wurden in der Dissertation von Stefan Grube beschrieben (Grube, 2008).

3.2.5. Ermittlung des apparenten Verteilungskoeffizienten

2,5 ml 1-Octanol und 2,5 ml 10 mM Phosphatpuffer mit pH 6,5 mit unterschiedlichen Konzentrationen an Gallenextrakt, 80 µg/ml Trospiumchlorid und 2,5 µCi/ml ³H-Trospium wurden in einem 15 ml Greiner Röhrchen auf einem Vortex gemischt. Danach wurden sie 2

Stunden lang bei $25\pm 2^\circ\text{C}$ auf einem Rad gedreht. Danach wurden je 200 μl der lipophilen und der wässrigen Phase entnommen und mit 4 ml Szintillationscocktail gemischt.

3.2.6. Zellkultur

Die Aufzucht der Zellen und der Monolayer erfolgte wie in 2.1.6 beschrieben.

3.2.7. Caco-2-Transport-Experimente

In einer Reihe von Experimenten wurden dem Donor-Puffer 10 $\mu\text{M/l}$ Trospiumchlorid zugesetzt. In einer anderen Reihe von Experimenten wurden dem Donor-Puffer 10 $\mu\text{M/l}$ Trospiumchlorid und 150 $\mu\text{M/l}$ Natriumtaurodesoxychololat zugesetzt. Ansonsten wurden die Experimente durchgeführt wie unter 2.1.7 beschrieben.

3.2.8. Entnahme und Präparation des Rattengewebes

Die Entnahme und Präparation des Rattengewebes erfolgte wie unter 2.1.8 beschrieben.

3.2.9. Herstellung der Olivenöl-Emulsion

22 mM Olivenöl (1,06 ml Olivenöl und 28,94 ml Donorlösung) wurden der Donorlösung hinzugefügt, was der Menge entspricht, die von Persson und anderen im fed state in menschlichem intestinalen Fluid gefunden wurde. Für die Berechnung des Molekulargewichtes von Olivenöl wurde von einem Triglycerid mit 3 Ölsäureresten ausgegangen. 22 mM Olivenöl, 8 mM TDOC oder GCDC, 2 mM Trospiumchlorid und KBR wurden in ein 50 ml Greiner-Röhrchen gegeben und 2 Minuten bei Raumtemperatur auf dem

Vortex vermischt. Danach wurde das Gemisch 4-mal bei 500 bar und danach 8-mal bei 1000 bar durch einen Hochdruckhomogenisator (Avestin Emulsiflex C3) gegeben.

3.2.10. Ussing-Kammer-Transport-Experimente

Für die Experimente wurden in verschiedenen Reihen auf der apikalen Seite der Membran Lösungen des Wirkstoffes mit oder ohne Zugabe verschiedener Gallensalze bzw. eine Emulsion mit Olivenöl eingesetzt. Ansonsten erfolgte die Durchführung der Experimente wie unter 2.1.10 beschrieben.

3.2.11. Analytische Methoden

Trospium Proben aus Ussing-Kammer-Experimenten

Die Messung der Trospium-Proben aus der Ussing-Kammer erfolgte wie unter 2.1.11 beschrieben.

Trospium Proben aus Zellversuchen

Es wurde eine LC/MS/MS-Analyse der Proben durchgeführt. Dazu wurde ein Agilent 1100 HPLC-System verwendet, das an ein API 3000 Massenspektrometer angeschlossen war. Eine C-18 Säule wurde benutzt (Kromasil 100, 50 x 2,1 mm, C-18, Partikelgröße 5 µm, MZ-Analysentechnik, Mainz).

Die Proben wurden unverdünnt injiziert. Trospium wurde mit einem Gradientensystem abgetrennt. Die mobile Phase bestand aus 0,1% Ameisensäure in Acetonitril (A) und 0,1% Ameisensäure in bidestilliertem Wasser (B) in unterschiedlichen Mengenverhältnissen. Der Gradient war folgendermaßen aufgebaut:

0-4.5 min	300 µl /min	10 % A	90 % B
4.5-6.3 min	300 µl /min	70 % A	30 % B
6.3-7.0 min	600 µl /min	50 % A	50 % B
7.0-7.1 min	300 µl /min	50 % A	50 % B
7.1-9.0 min	300 µl /min	10 % A	90 % B

Multiples Reaktions-Monitoring wurde mit den Übergängen Q_1/Q_3 : 392.207 \rightarrow 182.201 durchgeführt. Die Quelltemperatur lag bei 400°C. Die Laufzeit betrug 9 Minuten. Das Injektionsvolumen betrug 5 µl.

Szintillationszählung

Der verwendete Szintillationszähler wurde von Frau Prof. Spah-Langguth zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden gründlich mit 4 ml der Szintillationslösung RotiszintTM22 vermischt (Carl Roth, Karlsruhe). Danach wurden die Proben in Mini vials A (Carl Roth) gegeben und mit einem Flüssigszintillationszähler LC 6000 (Beckman Coulter, Unterschleissheim) gezählt. Die Zählzeit betrug bei allen Proben und Experimenten 5 Minuten.

3.2.12. Statistische Methoden

Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test bei einer statistischen Sicherheit von 95% durchgeführt. P-Werte unterhalb von 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Enzymatischer Gallensalz-Nachweis

Die Gallensalzkonzentrationen wurden mittels der im Methodenteil beschriebenen Methode bestimmt. Eine Gesamtkonzentration an Gallensalzen von $1,27 \pm 0,02 \mu\text{mol/mg}$ (arithmetisches Mittel aus 3 Messungen \pm Standardabweichung) wurde in BEP gefunden. In BB wurde eine Gesamtkonzentration von $1,17 \pm 0,03 \mu\text{mol/mg}$ gefunden ($n=3 \pm \text{SD}$).

3.3.2. $^1\text{H-NMR}$

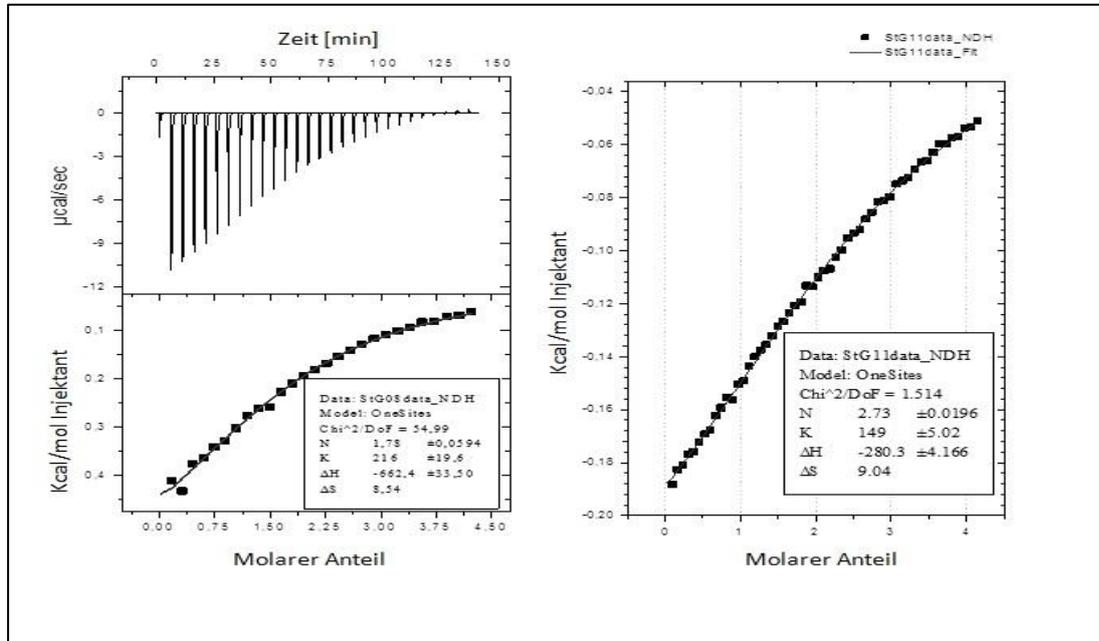
Glycin- und Taurin-Konjugate von Gallensalzen zeigten deutliche Unterschiede in der chemischen Verschiebung, lagen weit getrennt und konnten klar und eindeutig identifiziert werden. Die Benutzung einer bekannten Konzentration an internem Standard erlaubte die Berechnung der Konzentration an Glycin- und Taurin-Konjugaten sowie die Berechnung der Gesamtkonzentration an Gallensalzen. Für BEP wurde eine Gesamtkonzentration von $1,23 \pm 0,07 \mu\text{mol/mg}$ berechnet. Die berechnete Gesamtkonzentration für BB war mit von $1,23 \pm 0,03 \mu\text{mol/mg}$ sehr ähnlich. Das molare Verhältnis von Taurin- und Glycin-Konjugaten lag für BB bei 1,39 und für BEP bei 0,12. BB enthielt im Vergleich zu BEP ungefähr sechs Mal mehr Taurin-Konjugate.

3.3.3. Isothermale Titrationskalorimetrie

Glycochendesoxycholat (GCDC)

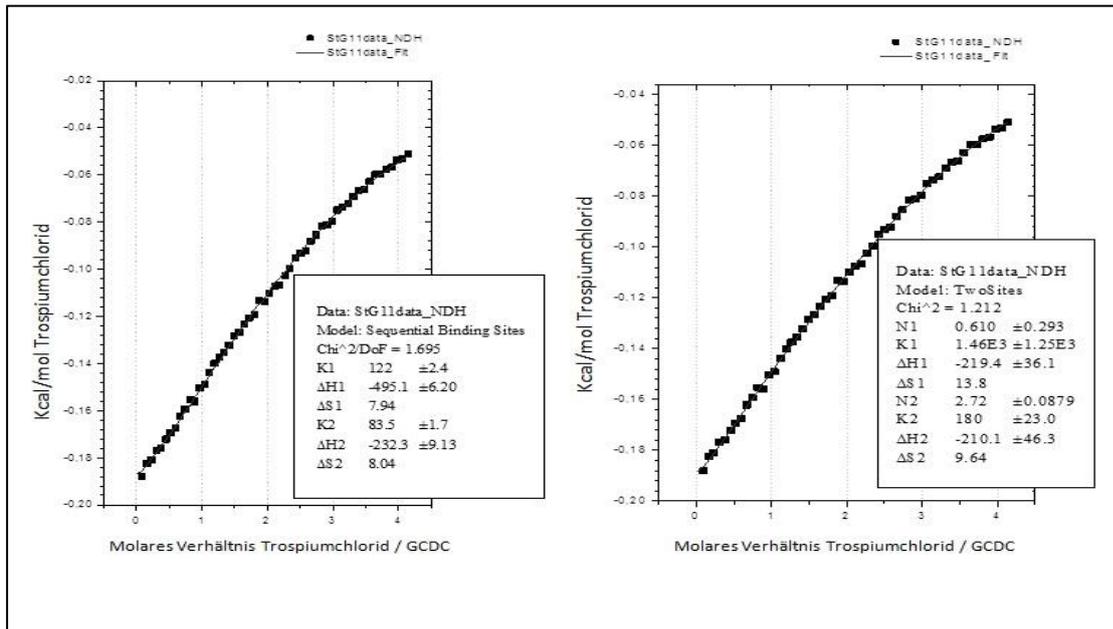
Die Figuren 3.1 und 3.2 zeigen die Titrations-Rohdaten und die integrierten Wärmekurven der Titrations-Experimente mit GCDC bei niedriger und hoher Salzkonzentration. Darüber hinaus

sind die thermodynamischen Daten dargestellt, welche durch Kurvenanpassung mit den verschiedenen Bindungsmodellen erhalten wurden.



Figur 3.1. (abgeändert aus Dissertation Grube, Mainz 2008) ITC einer 5 mM GCDC Lösung mit einer 100 mM Trospiumchlorid-Lösung. Bedingungen: 10 mM Phosphat-Puffer, 37°C ohne (links) und mit 0.1M NaCl (rechts). Links: Oben werden die Titrations-Rohdaten gezeigt, während unten die integrierte Wärme (■) und die Funktion der Anpassung (-) gezeigt werden. Rechts: Die integrierte Wärme (■) und die beste Anpassung (-) für das Bindungsmodell für eine Bindungsart

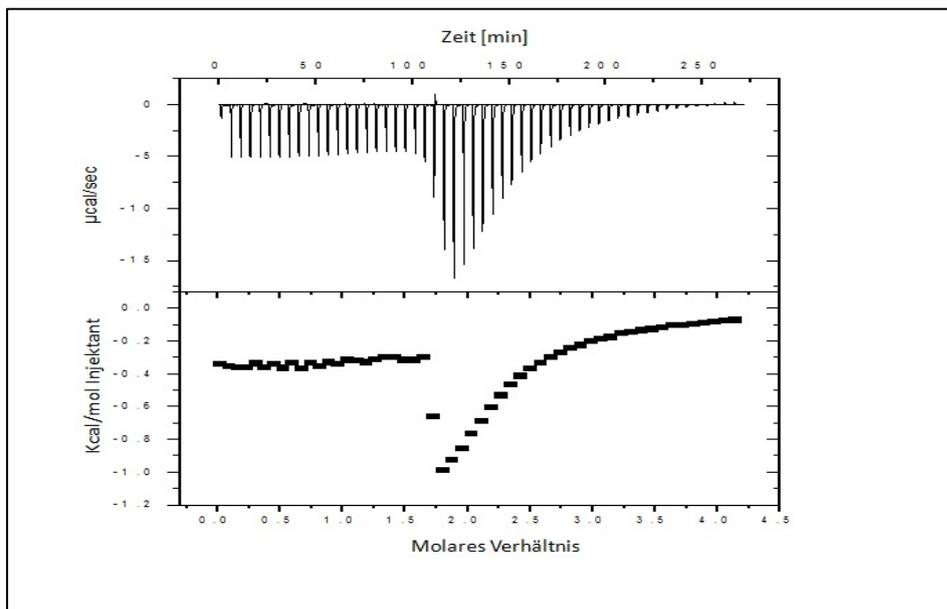
Ionenpaarbildung mit Gallensalzen verändert die intestinale Permeabilität und erklärt die Nahrungsmittelinteraktion der BCS Klasse III Substanz Trospiumchlorid



Figur 3.2. (abgeändert aus Dissertation Grube, Mainz 2008) ITC einer 5 mM GCDC Lösung mit einer 100 mM Trospiumchlorid-Lösung. Bedingungen: 10 mM Phosphat-Puffer pH 6.5, 100 mM NaCl, 37°C, gezeigt wird die integrierte Wärme (■). Die gepunktete Linie zeigt die beste Anpassung für das sequentielle (links) und das zweiseitige (rechts) Bindungsmodell.

Taurochenodesoxycholat (TCDC)

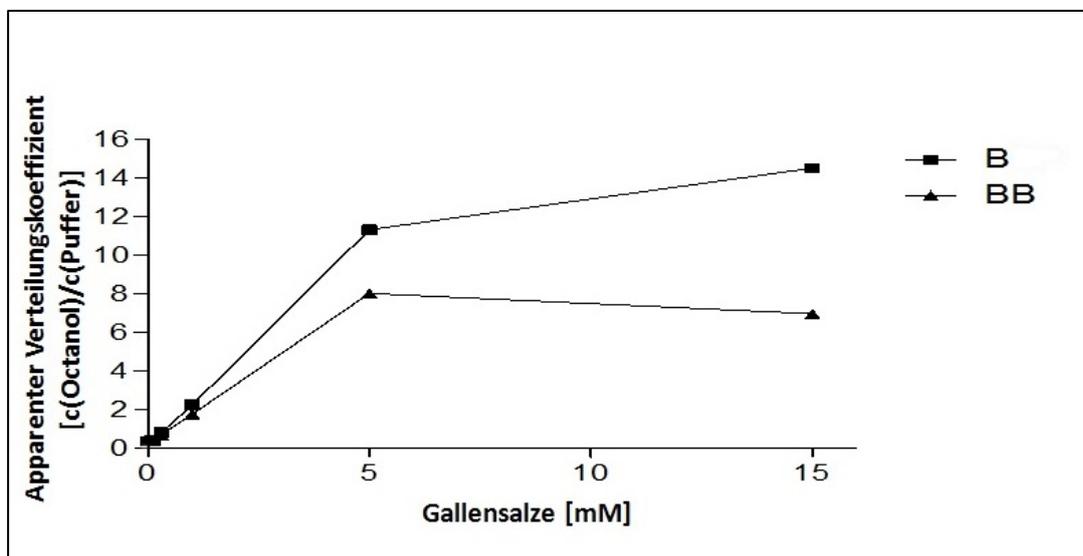
Es war mit keinem der 3 Bindungsmodelle möglich, eine vernünftige Anpassung der Kurve vorzunehmen. Es wurde daher kein Modell für die Bindung von Trosipium zu TCDC ermittelt. Die Daten, welche in Figur 3.3 dargestellt sind, sprechen jedoch für eine Komplexierung zwischen Trosipium und TCDC



Figur 3.3. (abgeändert aus Dissertation Grube, Mainz 2008) ITC einer 5 mM GCDC Lösung mit einer 100 mM Trosipiumchlorid-Lösung. Bedingungen: 10 mM Phosphat-Puffer pH 6.5, 100 mM NaCl, 37°C; oben werden die Titrations-Rohdaten gezeigt, während unten die integrierte Wärme (■) dargestellt ist.

3.3.4. Ermittlung des apparenten Verteilungskoeffizienten

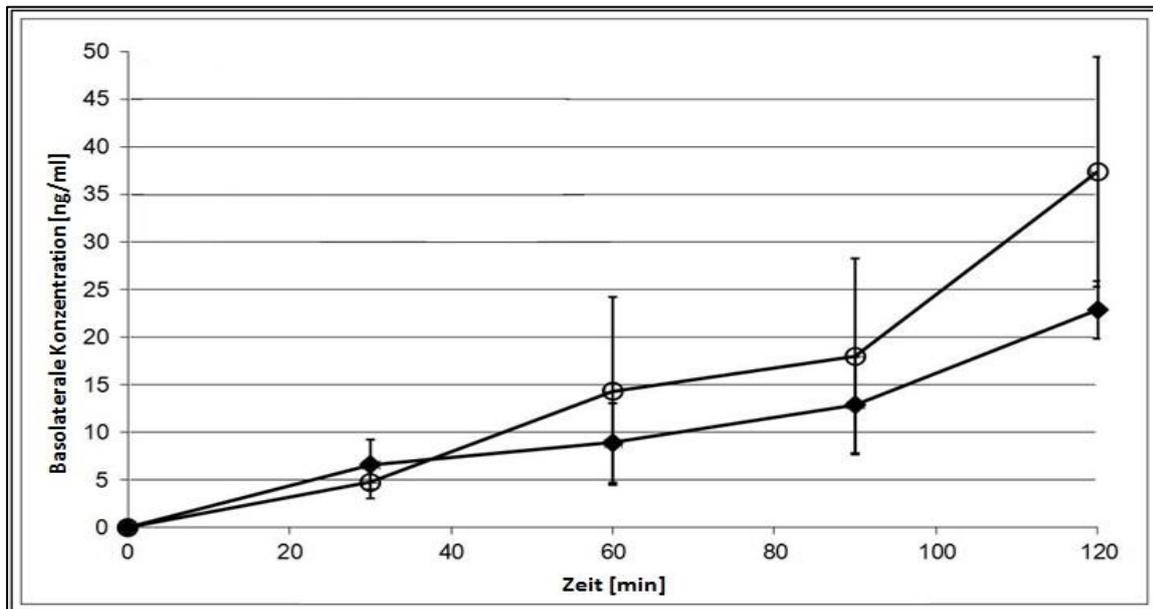
In Figur 3.4 ist der Effekt verschiedener Konzentrationen an BB und BEP auf den apparenten Verteilungskoeffizienten von Trospium zwischen Puffer (10 mM Phosphatpuffer pH 6,5, 0,1 M NaCl) und 1-Octanol dargestellt. Bei Zusatz von sowohl BB als auch BEP stieg der apparente Verteilungskoeffizient zunächst konzentrationsabhängig. Während der apparente Verteilungskoeffizient bei Steigerung der Konzentration von BEP auf 15 mM weiter anstieg, fiel er bei Steigerung der Konzentration von BB auf 15 mM leicht ab.



Figur 3.4. (abgeändert aus Dissertation Grube, Mainz 2008) Gezeigt wird der apparente Verteilungskoeffizient von ^3H -Trospium in Gegenwart von Gallenextrakten (BEP=bile extract porcine; BB=bile bovine). Der apparente Verteilungskoeffizient wurde in 10 mM Phosphat-Puffer pH 6.5 als wässriger Phase und 1-Octanol als lipophiler Phase bestimmt. Die Standardabweichung lag unter 10 %.

3.3.5. Caco-2-Transport-Experimente

Ein möglicher Einfluss von TDOC auf die Permeation von Trospium über einen Caco-2-Monolayer wurde untersucht. Die Ergebnisse sind in Figur 3.5 dargestellt. Man kann eine Tendenz zur Erhöhung der Trospium-Permeation nach 60 Minuten erkennen, jedoch sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant.



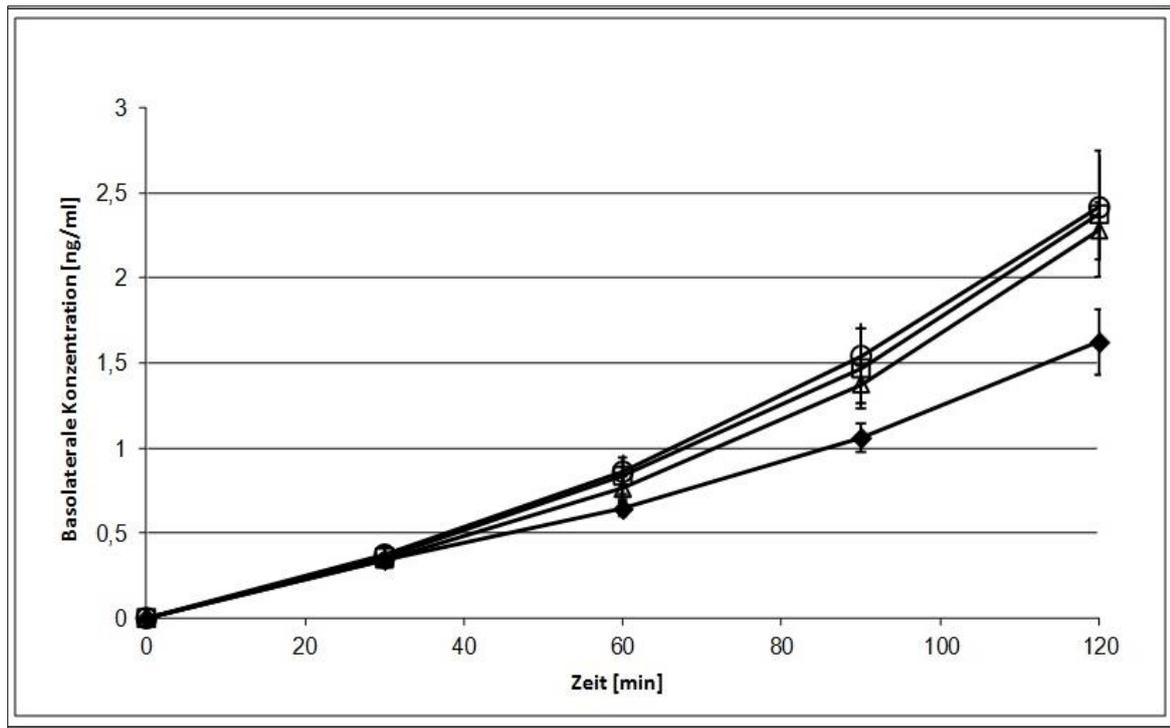
Figur 3.5. Vergleich der Permeation einer 15 µM Trospiumchlorid-Lösung mit (○) und ohne (◆) Zusatz einer 150 µM TDOC-Lösung über einen Caco-2-Monolayer (Apikal nach basolateral).

3.3.6. Ussing-Kammer-Transport-Experimente

Da die Ussing-Kammer ein physiologischeres Modell darstellt, das in den meisten Fällen eine relativ genaue Vorhersage der Permeation in vivo im Menschen erlaubt, wurde die Möglichkeit getestet, die Daten aus dem Caco-2-Modell auf dieses Modell zu übertragen, um eine noch zuverlässigere Methode für weitere Tests zu finden.

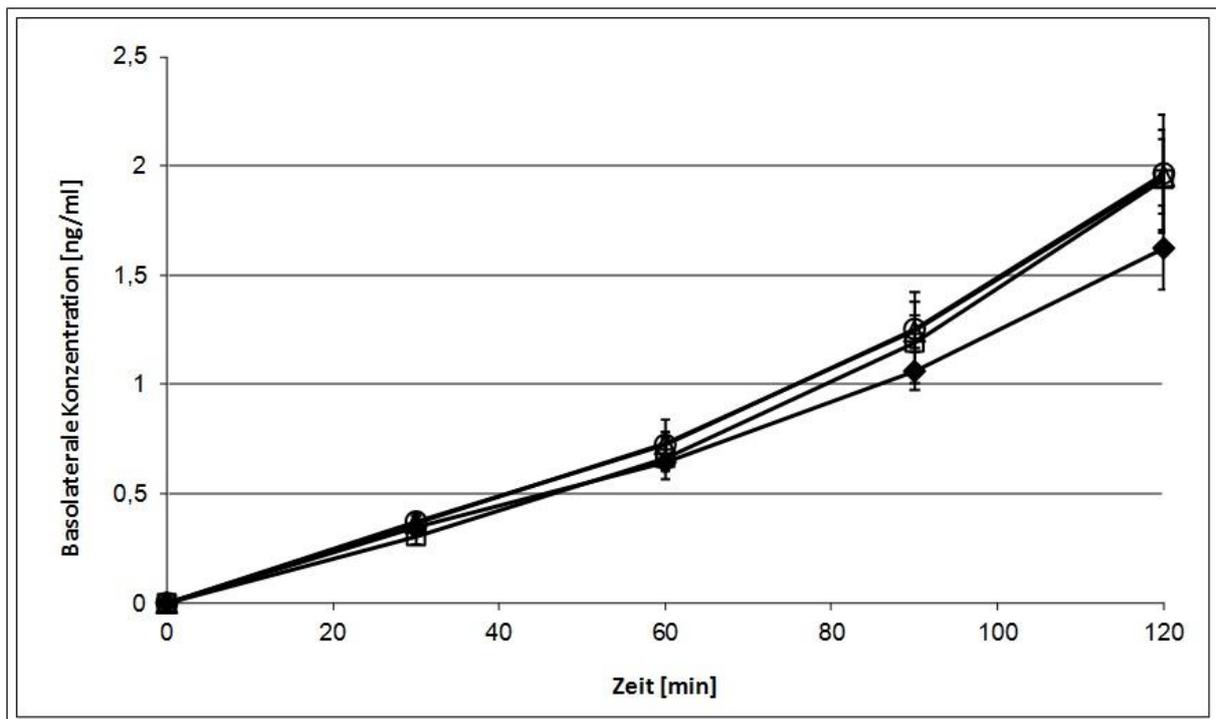
In Figur 3.6 wird der Einfluss verschiedener Konzentrationen an TDOC auf die Permeabilität von Trospium (apikal nach basolateral) über isoliertes Rattenjejunum, das in einer

modifizierten Ussing-Kammer eingespannt wurde, dargestellt. Eine Konzentration von 0,5 mM TDOC führt zu einer Steigerung des Trospium-Fluxes um Faktor 1,5. Eine weitere Erhöhung der Konzentration an TDOC auf 2 bzw. 8 mM führt zu keiner weiteren Steigerung der Trospium-Permeation.



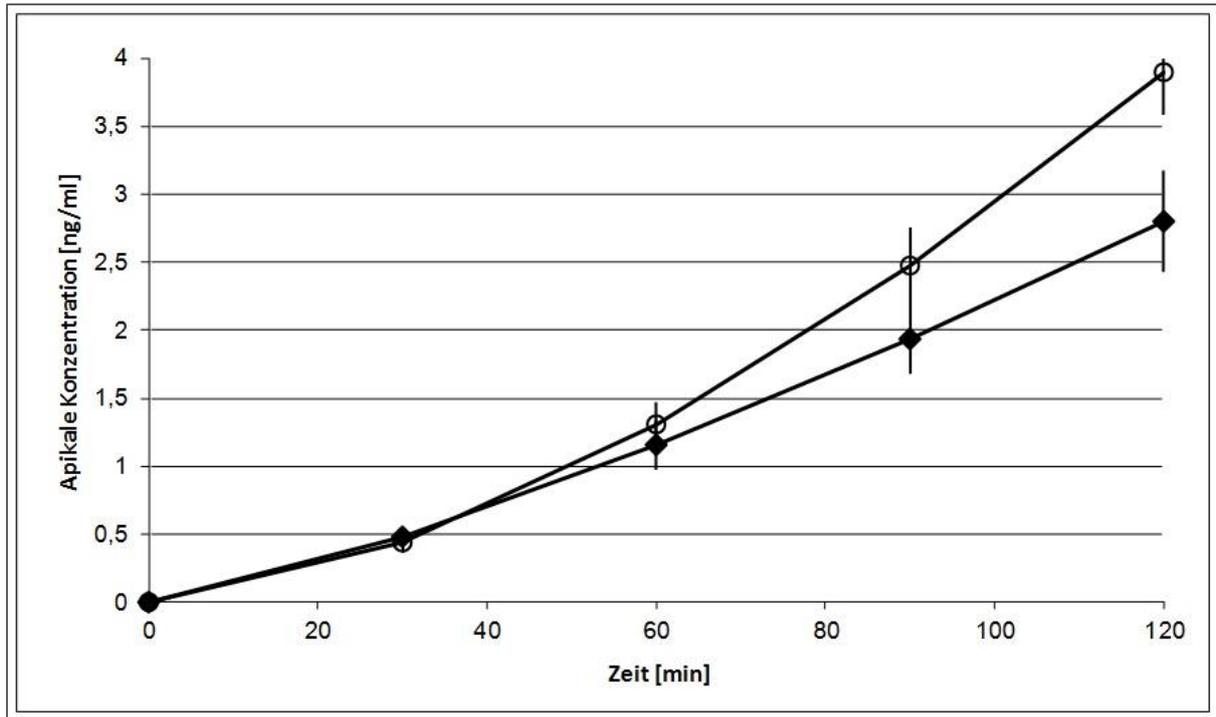
Figur 3.6. Vergleich der Permeation einer 2mM Trospiumchlorid-Lösung mit 0.5 mM TDOC (○), 2mM TDOC (□), 8mM TDOC (△) und ohne (◆) TDOC über isolierte Segmente frisch entnommenen Ratten-Jejunums in einer modifizierten Ussing-Kammer (Apikal nach basolateral)

Figur 3.7 zeigt den Einfluss verschiedener Konzentrationen an GCDC auf die Permeabilität von Trospium (apikal nach basolateral). Die Resultate ähneln den mit TDOC gewonnenen Ergebnissen. Eine Konzentration von 0,5 mM GCDC führt zu einer Steigerung der Permeation um ca. Faktor 1,25. Eine weitere Steigerung der Konzentration auf 2, bzw. 8 mM führt auch hier zu keiner weiteren Erhöhung des Trospium-Fluxes.



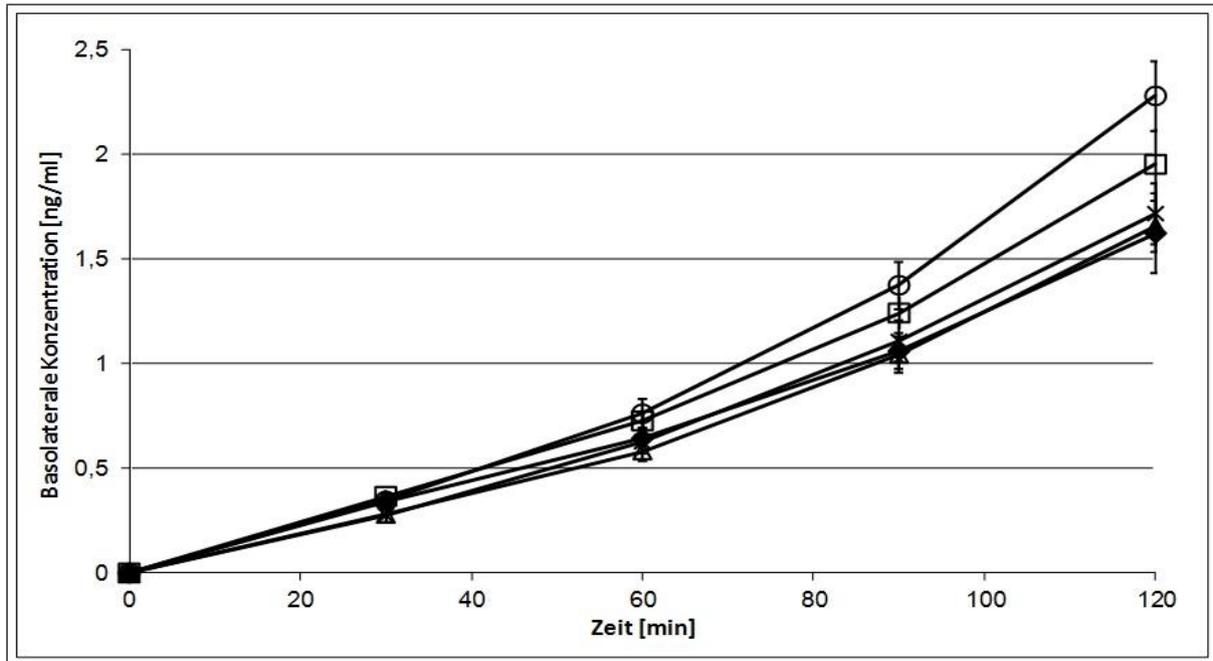
Figur 3.7. Vergleich der Permeation einer 2mM Trospiumchlorid-Lösung mit 0.5 mM GCDC (○), 2mM GCDC (□), 8mM GCDC (△) und ohne (◆) GCDC über isolierte Segmente frisch entnommenen Ratten-Jejunums in einer modifizierten Ussing-Kammer (Apikal nach basolateral)

Figur 3.8 zeigt den Effekt von 0,5 mM TDOC auf die Permeation von Trospium in basolateraler nach apikaler Richtung. Der Trospium Flux ist ohne Zusätze im Vergleich zum apikal nach basolateralen Flux um Faktor 1,7 höher. Der Zusatz von 0,5 mM TDOC führt zu einer Steigerung der Permeation um etwa Faktor 1,5.



Figur 3.8. Vergleich der Permeation einer 2mM Trospiumchlorid-Lösung mit 0.5 mM TDOC (○) und ohne (◆) TDOC über isolierte Segmente frisch entnommenen Ratten-Jejunums in einer modifizierten Ussing-Kammer (Basolateral nach apikal)

Figur 3.9 zeigt den Einfluss von 8 mM TDOC bzw. 8 mM GCDC auf die Permeation von Trospium aus einer Olivenöl-Emulsion. Bei beiden Gallensalzen führte der Zusatz von Olivenöl zu einer kompletten Auslöschung des Effektes.



Figur 3.9. Vergleich der Permeation einer 2mM Trospiumchlorid-Lösung (◆), einer Trospiumchlorid-Lösung mit 8 mM TDOC (○), 8mM GCDC (□), 8mM TDOC in Gegenwart von 22 mM Olivenöl (X) und 8 mM GCDC in Gegenwart von 22 mM Olivenöl (Δ) über isolierte Segmente frisch entnommenen Ratten-Jejunums in einer modifizierten Ussing-Kammer (Apikal nach basolateral)

3.4. Diskussion und Fazit

Es ist bekannt, dass organische Kationen an Gallensalze binden. In dieser Studie wurde untersucht, ob auch das organische Kation Trospiumchlorid Bindungen mit Gallensalzen eingeht und ob diese Ionenpaarbildung teilweise für den negativen Food-Effekt von Trospium verantwortlich ist.

Die thermodynamischen Daten, die mittels ITC ermittelt wurden, passten nur für die Interaktion zwischen Trospium und GCDC, jedoch nicht für die Interaktion zwischen

Trospium und TCDC in ein gängiges Bindungsmodell. Eine Interaktion zwischen TCDC und Trospium kann zwar beobachtet werden, ist jedoch schwierig zu erklären. Die Bindungskonstanten der Interaktion zwischen Trospium und GCDC waren niedrig und an der Grenze des mittels ITC Nachweisbaren. Eine Interaktion zwischen Gallensalz und Trospium kann jedoch unwiderlegbar gezeigt werden.

Die Wärmekurven, die sich aus der ITC ergeben haben, wurden mit 3 Standardmodellen angepasst, dem Bindungsmodell für eine Bindungsart, dem sequenziellen Bindungsmodell und dem Bindungsmodell für zwei Bindungsarten. Obwohl das komplexe Modell der Mizellen wahrscheinlich keinem dieser Modelle vollständig entspricht, zeigten die Anpassungen mittels sequenziellem Bindungsmodell und dem Bindungsmodell für eine Bindungsart niedrige Fehlervariablen für Bindungskonstante und Enthalpie, und χ^2/DoF als Maß für die Güte einer Anpassung war auch gering. Diese Modelle sind also prinzipiell geeignet, die beobachteten Ergebnisse zu beschreiben.

Die im Bindungsmodell für eine Bindungsart ermittelte Stöchiometrie der Reaktion in 0,1 M NaCl lag bei 2,78, was bedeuten würde, dass ein Molekül GCDC 2,78 Moleküle Trospium bindet. GCDC besitzt nur eine negative Ladung, die durch ein einziges Trospium Molekül ausgeglichen werden könnte. Dies legt nahe anzunehmen, dass es neben der Interaktion über die entgegengesetzte Ladung noch zu weiteren Arten von Interaktionen zwischen Trospium und GCDC kommt wie zum Beispiel zu hydrophoben Wechselwirkungen. Wenn die Bindungskonstante einer solchen Interaktion der Bindungskonstante der angenommenen ionischen Wechselwirkung ähnlich wäre, wäre keine Unterscheidung beider Bindungsarten möglich und die Reaktion könnte in das Bindungsmodell für eine Bindungsart passen. Tatsächlich konnten mit dem sequenziellen Bindungsmodell zwei Bindungskonstanten sehr ähnlicher Größe in 0,1 M NaCl gefunden werden, von denen sich eine der hydrophoben und die andere der Ladungsinteraktion zuordnen ließe.

Mit enzymatischem Gallensalz Nachweis und $^1\text{H-NMR}$ konnte gezeigt werden, dass BB und BEP stark unterschiedliche Gallensalzzusammensetzungen enthalten. Der Hauptunterschied bestand darin, dass Rindergalle im Vergleich zu Schweinegalle sechs Mal mehr mit Taurin

konjugierte Gallensalze enthielt. Die Gesamtkonzentration an Gallensalzen lag in beiden Mischungen bei ca. 1,2 $\mu\text{mol/mg}$.

Der apparente Verteilungskoeffizient von Trospium stieg mit wachsender Gallensalzkonzentration an, das heißt, dass in Gegenwart von Gallensalzen der Anteil an Trospium in der lipophilen Phase größer war. Bei Zusatz von 5 mM Gallensalz war der apparente Verteilungskoeffizient im Vergleich zur Kontrolle (AVK=0,38) mit Rindergalle um Faktor 21, mit Schweingalle um Faktor 30 erhöht. Rindergalle und Schweingalle zeigten bei Konzentrationen über 5 mM unterschiedliches Verhalten. Während mit BEP der AVK bis zu einer Konzentration von 15 mM konstant anstieg, fiel er bei Zusatz von BB über 5 mM leicht ab. Insgesamt lässt sich sagen, dass BB den AVK von Trospium bei gleicher Konzentration weniger gesteigert hat als BEP. Eine mögliche Erklärung liefert der höhere Anteil an Gallensalzen mit 3 Hydroxy-Gruppen in Rindergalle. Song und andere konnten zeigen, dass Trihydroxy-Gallensalze (also Cholate) weit weniger effektiv bei der Erhöhung des AVK des Kations TBuMA waren [304, 305]. Rindergalle ist dafür bekannt, einen hohen Anteil an Cholaten zu enthalten und wird auch zur Gewinnung von Taurocholat verwendet [306, 307]. Dies könnte bedeuten, dass die Konzentration an Gallensalzen, die lipophile Ionenpaare mit Trospium bilden, die sich dann vermehrt in der lipophilen Phase verteilen, in BB im Vergleich zu BEP wesentlich geringer ausfällt. Die verschiedene Zusammensetzung beider Gallenextrakte könnte auch die Erklärung dafür liefern, dass sich bei Zusatz von BB ab 15 mM der AVK leicht verringert. Grund dafür könnte ein unterschiedliches Verhalten bei der Selbstemulgierung beider Gallensalzextrakte bei unterschiedlichen Konzentrationen sein.

Im Caco-2-Modell konnte gezeigt werden, dass 150 μM TDOC nach 120 Minuten zu einer um ca. Faktor 1,7 erhöhten Permeation von 15 μM Trospium führen. Bei den vorher durchgeführten Messungen war die Erhöhung der Permeation geringer. Aufgrund der hohen Standardabweichungen waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant.

Im Ussing-Kammer-Modell führte der Zusatz von TDOC in einer Konzentration von 0,5 mM zu einer um Faktor 1,5 vergrößerten Trospium-Permeation. Eine weitere Erhöhung der TDOC Konzentration führte zu keiner weiteren Erhöhung des Trospium-Fluxes. Auf Grundlage der ITC Ergebnisse beträgt das theoretische Bindungsverhältnis zwischen GDCD und Trospium

2,78. Ein Molekül GCDC würde also 2,78 Moleküle Trospium binden. Bei einer Konzentration von 0,5 mM wäre also fast das gesamte Trospium gebunden und der Zusatz weiteren Gallensalzes würde nicht zu einer weiteren Verbesserung der Permeation führen. Der quantitative Unterschied in der Verbesserung der Permeation zwischen den Modellen kann mit dem Vorhandensein von Mukus erklärt werden. Während das im Ussing-Kammer-Modell eingesetzte Rattenjejenum Mukus bildet, fehlt dieser im Caco-2-Modell. In früheren Studien wurde gezeigt, dass Trospium an Mukus bindet. Eine Entfernung der Ladung durch Ionenpaarbildung führt als Konsequenz nicht nur zu einer veränderten Verteilung zwischen Wasser und der zellulären Barriere, sondern auch zu einer reduzierten Interaktion mit intestinalem Mukus [268].

Der Einsatz von GCDC anstelle von TDOC führte zu ähnlichen Resultaten. GCDC hatte im Vergleich zu TDOC jedoch eine geringere Effektivität bei der Erhöhung des Trospium-Fluxes. Wenn man annimmt, dass die erhöhte Permeation in erster Linie durch eine verbesserte passive Diffusion der lipophileren Ionenpaare zustande kommt, steht dieses Ergebnis in Einklang mit den Ergebnissen von Song und anderen [304], die demonstrieren haben, dass TDOC im Vergleich zu GCDC zu einer stärkeren Verschiebung des AVK von TBuMA führt. Die gute Korrelation zwischen der Erhöhung des AVK und der Verbesserung der Permeation sowie die Tatsache, dass eine weitere Erhöhung der Gallensalz-Konzentration nicht zu einer weiteren Verbesserung der Permeation führte, sprechen dafür, dass die Verbesserung der Permeation durch die Ionenpaarbildung zustande kam und nicht das Ergebnis einer konzentrationsabhängigen Öffnung von tight junctions durch Gallensalze ist, wie sie in früheren Publikationen beschrieben wurde [96, 308].

Der Flux in basolateraler nach apikaler Richtung ist für Trospiumchlorid selbst höher als in umgekehrter Richtung. Die Zugabe von 0,5 mM TDOC führte auch in basolateraler nach apikaler Richtung zu einer Verbesserung der Permeation um Faktor 1,5. Dies kann als weiterer Indikator dafür gesehen werden, dass die verbesserte Permeation durch höhere passive Diffusion zustande kommt.

Es ist bekannt, dass die Konzentration an Gallensalzen im Dünndarm im postprandialen Zustand (ca. 15 mM) wesentlich höher ist als im nüchternen Zustand (ca. 3 mM) [302, 309].

In Anbetracht dieser Tatsache könnte man vermuten, dass die höhere Konzentration an Gallensalzen im postprandialen Zustand zu einer verbesserten Permeation von Trospium führt. Um die physiologischen Bedingungen besser nachzuahmen, wurde eine Olivenöl-Emulsion als Donor-Lösung hergestellt. Dies führte zu einer kompletten Auslöschung des Effektes von TDOC. Die Erklärung liegt darin, dass TDOC benötigt wird, um das Fett zu emulgieren und daher nicht mehr für die Ionenpaarbildung mit Trospium zur Verfügung steht. Dies könnte auch der Mechanismus für die geringere Bioverfügbarkeit von Trospium im postprandialen Zustand sein. Es ist allerdings nicht möglich, das komplette Ausmaß des negativen Food-Effektes von Trospium mit diesem Mechanismus allein zu erklären. Wenn man jedoch den unvollständigen Zerfall von Tabletten im postprandialen Zustand, wie er von Radwan und anderen [310] beschrieben wurde, in die Überlegung mit einbezieht, kann das Ausmaß des Food-Effektes durchaus erklärt werden. Ein weiterer Mechanismus, der eine Rolle spielen könnte, ist eine erhöhte biliäre Exkretion, wie sie von Song und anderen [304] beschrieben wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ionenpaarbildung mit Gallensalzen mit großer Wahrscheinlichkeit zum negativen Food-Effekt von Trospiumchlorid beiträgt. Dieses Ergebnis lässt sich wohl auch auf andere organische Kationen übertragen, die einen negativen Food-Effekt zeigen und an Gallensalze binden.

4. Einfluss des Absorptionsmodulators Eudragit E auf die orale Absorption der BCS-Klasse-III-Substanz Trospiumchlorid in vivo in Ratten

4.1. Einleitung

Löslichkeit und intestinale Permeabilität eines Wirkstoffs bestimmen das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt und sind abhängig von den strukturellen Eigenschaften des Moleküls [311]. Zudem ist die Bioverfügbarkeit nach peroraler Gabe durch den First-pass-Effekt limitiert, der ebenfalls von der Molekülstruktur abhängt. Daneben sind Ausmaß und Geschwindigkeit der Arzneistoffinputs in den Organismus durch eine Vielzahl physiologischer Prozesse mitbestimmt, die die Variabilität in den Konzentrationsprofilen im Blut und am Wirkort erhöhen können. Dennoch sind oral applizierbare Arzneiformen aufgrund ihrer Vorteile in der Handhabung in der Routine der Pharmakotherapie anderen Applikationswegen in der Regel überlegen. Bei der Formulierungsentwicklung sind die Identifizierung und der Einsatz von Hilfsstoffen, die die Löslichkeit und die Permeabilität einer Substanz verbessern, nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung. Zu erwähnen sind in diesem Zusammenhang die Inhibition von Efflux-Transportern wie PGP durch Hilfsstoffe wie Vitamin E TPGS [249] bzw. die Veränderung der intestinalen Permeabilität durch Substanzen wie EDTA [161], Gallensalze [312, 313] oder Natriumdodecylsulfat [248].

Eine Möglichkeit, die parazelluläre Permeabilität zu verbessern, stellt die Öffnung von tight junctions dar, und verschiedene Hilfsstoffe können in der Tat die Funktionalität von tight junctions auf verschiedene Arten beeinflussen [250]: Chitosan und seine Derivate öffnen tight junctions durch Bindung an die Zelloberfläche und Interaktion mit dem F-Aktin des Zytoskeletts und der Zonula occludens [148, 314]. Mittelkettige Fettsäuren wie Natriumdecanoat, das bereits klinisch angewendet wird, öffnen tight junctions durch Aktivierung der Phospholipase C und weitere sequentielle Prozesse auf zellulärer Ebene [138, 253]. U.a. soll Natriumdecanoat auch über seine Interaktion mit Membranproteinen und

Membranlipiden eine erhöhte Membran-Fluidität und damit eine Veränderung der transzellulären Permeabilität herbeiführen [139].

Wie vorher beschrieben (Vgl. Kapitel 1.5.3) konnte gezeigt werden, dass durch Eudragit E und seine (teilweise quaternisierten) Derivate die Permeabilität verschiedener Substanzen über Caco-2-Zell-Monolayer in vitro erhöht werden kann [23, 316]. Eudragit E wird als zugelassener Hilfsstoff beispielsweise in Zubereitungen für die orale und transdermale Anwendung eingesetzt [315].

Ziel der Rattenstudien mit Tropiumchlorid, einem Wirkstoff aus der BCS-Klasse III mit geringer oraler Bioverfügbarkeit, ist die Überprüfung der In-vivo-Relevanz der Ergebnisse aus den In-vitro-Versuchen. Das gut wasserlösliche Tropium weist - wie andere strukturell ähnliche Substanzen - aufgrund seiner quartären Ammoniumstruktur und seiner relativ hohen molekularen Masse (428 bzw. 393 als Kation) eine geringe intestinale Permeabilität auf. Tropium bindet zudem an intestinalen Mukus und stellt ein Substrat des Efflux-Transporters PGP dar [11, 268, 269, 317, 318]. Wie für einen Wirkstoff mit diesen Charakteristika zu erwarten ist, ist die Absorption durch Nahrungszufuhr beeinflusst. Bei Einnahme mit Nahrung sinkt die systemische Verfügbarkeit von Tropium um weitere 80% (von ca. 10% auf ca. 2%). In Humanstudien war nachgewiesen worden, dass die Elimination von Tropium metabolische und renale Clearancewege beinhaltet. Als ein Eliminationsweg ist z.B. die Esterspaltung unter Bildung des entsprechenden Spiroalkohols beschrieben [317].

4.2. Material und Methoden

4.2.1. Materialien

Sprague-Dawley-Ratten wurden vom Institut für Ophthalmologie in Gizeh bezogen. Eudragit E stammte von Degussa in Darmstadt. Tropiumchlorid wurde von der Firma Pfleger (Bamberg) zur Verfügung gestellt. PBS (Phosphate buffered saline) wurde von Gibco (Darmstadt) bezogen.

Wirkstoff/Hilfsstoff-Zubereitungen:

Lösung A:

Lösung von 2 mg/ml Trospiumchlorid zur peroralen Applikation in PBS ohne permeationsverbessernde Zusätze.

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1M HCl auf 4 eingestellt. Diese Lösung wurde der Kontrollgruppe appliziert.

Lösung B:

Lösung von 2 mg/ml Trospiumchlorid zur peroralen Applikation in PBS mit 30 mg/ml Eudragit E.

Der pH-Wert wurde wiederum mit 1M HCl auf 4 eingestellt. Diese Lösung wurde der Testgruppe appliziert.

Lösung C:

Lösung von 0,5 mg/ml Trospiumchlorid in PBS ohne Hilfsstoffzusatz zur intravenösen Applikation.

Diese Lösung wurde zur Abschätzung der absoluten Bioverfügbarkeit der i.v.-Referenzgruppe appliziert.

Die Tiere erhielten peroral eine Trospiumchlorid-Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht (in Form von Lösung A oder B) oder intravenös eine Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht (in Form von Lösung C).

4.2.2. Tiere

Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 250 g wurden wenigstens eine Woche vor Beginn der Experimente geliefert. Die Tiere wurden in Käfigen bei 23-25°C und 55±15% Luftfeuchtigkeit in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Sie erhielten 12 Stunden vor und während des Experimentes keine Nahrung, hatten jedoch unbeschränkten

Zugang zu Wasser. Die Experimente wurden in der Fakultät für Veterinärmedizin an der Tanta Universität in Kafr El-Sheikh in Ägypten durchgeführt. Die Experimente waren von der zuständigen Kommission der Universität für Ethik in tierexperimentellen Studien genehmigt.

4.2.3. Loop-Studien bei Ratten

Insgesamt wurden Versuche an insgesamt 8 Tieren durchgeführt. Die Hälfte des Kollektivs erhielt 5ml/kg Körpergewicht von Lösung A, die andere Hälfte erhielt 5ml/kg Körpergewicht von Lösung B. Zielparameter war die Plasmakonzentration. Ansonsten wurden die Versuche in gleicher Art und Weise durchgeführt, wie unter 2.2.5 beschrieben ist.

4.2.4. In-vivo-Studien bei Ratten

Kurz (2-3 Tage) vor Beginn der Versuche wurde den Ratten ein Katheter in die Vena jugularis eingesetzt. In der Nacht vor den Experimenten erhielten die Tiere keine Nahrung. Die Hälfte des Kollektivs (4 Tiere) erhielt 5 ml/kg Körpergewicht von Lösung A, 4 andere Tiere die gleiche Menge von Lösung B per Schlundsonde, 4 weitere Tiere erhielten 2 ml/kg Körpergewicht von Lösung C intravenös, um durch den AUC-Vergleich die absolute Bioverfügbarkeit ohne und mit Hilfsstoff zu ermitteln. Unmittelbar nach Beendigung des Experimentes wurde den Tieren eine KCl-Lösung injiziert.

4.2.5. Blutentnahmen und Probenbehandlung

Im Rahmen der Loop-Studien wurden Blutproben von 300 µl nach 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240 und 300 Minuten entnommen. Im Rahmen der In-vivo-Studien wurden Blutproben von 300 µl nach 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 720 und 1440 Minuten entnommen. Zu jedem der Entnahmezeitpunkte wurde das entnommene Volumen durch isotonische Kochsalzlösung

ersetzt, der 100 IE Heparin/ml zugesetzt waren. Die Blutproben wurden in heparinisierten Gefäßen gesammelt und auf Eis gelagert, um Ex-vivo-Hydrolyse zu verhindern. Nach ungefähr 45 Minuten wurden die Proben bei 6000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, um Plasma zu gewinnen. Plasma wurde abgetrennt und bis zur Analyse mittels LC/MS/MS bei -18°C aufbewahrt.

4.2.6. Analytische Methoden

Die quantitative Bestimmung von Trospium in Plasmaproben erfolgte wie unter 2.2.11 beschrieben.

4.2.7. Ermittlung pharmakokinetischer Parameter

Die Auswertung der Konzentrations-Zeit-Profile erfolgte nichtkompartimentell sowie auf der Basis eines Zwei-Kompartiment-Dispositions-Modells mithilfe von Kurvenanpassungen. Die Koeffizienten und Exponenten eines offenen 2-Kompartiment-Modelles wurden mit dem PK-Anpassungsprogramm Topfit (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart) an die Daten angepasst, das auf der Kombination eines modifizierten Gauss-Newton-Algorithmus und des Simplex-Algorithmus basiert.

Die Gleichung für die Dispositionsprozesse zusammen mit der Absorption aus einem Input-Kompartiment ist wie folgt:

$$C(t) = C_1 \cdot e^{-\lambda_1(t-t_{lag})} + C_2 \cdot e^{-\lambda_2(t-t_{lag})} - C_0 \cdot e^{-k_{in}(t-t_{lag})}$$

wobei C_1 and C_2 Hybridkoeffizienten sind und λ_1 und λ_2 die Hybridexponenten. C_0 repräsentiert Dosis * F/V, k_{in} ist Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für den Input und t_{lag} die lag-Zeit.

Für die Dosierung in den Gastrointestinaltrakt bzw. die Absorption aus dem GI-Trakt wurde ein multisegmenteller Input angenommen (Annahme: In alle Input-Segmenten ist der Input ein Prozess 1. Ordnung).

Jedes Input-Segment ist dabei durch 3 Parameter charakterisiert: (1) die relative Dosisfraktion $f_{a,i}$, (2) die Geschwindigkeitskonstante für den Input $k_{in,i}$ und (3) die lag-Zeit $t_{lag,i}$. ($t_{lag,1}$ = initiale lag-Zeit).

$$C_{in}(t) = \sum_{i=1}^n f_{a,i} \left(1 - e^{-k_{in,i}(t-t_{lag,i})} \right)$$

Das resultierende Input-Profil ergibt sich durch Superposition der individuellen Input-Segmente.

Aufgrund der starken interindividuellen Variabilität der Input-Profile wurden die mittleren Input-Zeiten (MIT_{tot}) als integrale Input-Parameter ermittelt, die zudem ggf. den Vergleich von Input-Parametern zulassen, die auf Basis unterschiedlicher Input-Modelle ermittelt wurden. Die Gesamt-MIT (totale MIT) ist dabei die Summe der Einzel-MITs für den Input bei dem entsprechenden Individuum:

$$MIT_{tot} = \sum_{i=1}^n f_{a,i} \left(\frac{1}{k_{in,i}} + t_{lag,i} \right)$$

Clearance und Verteilungsvolumen wurden als primäre kinetische Parameter aus der biexponentiellen Funktion nach intravenöser Gabe ermittelt. Die Kurvenparameter für die intestinale Absorption wurden durch simultanes Curve-fitting erhalten (Wichtung des i.v.-Datensatzes 0,2).

4.2.8. Statistische Methoden

Die statistische Analyse wurde mit dem T-Test für unabhängige Variable bei einer statistischen Sicherheit von 95% durchgeführt. P-Werte unterhalb von 0,05 wurden als signifikant angesehen.

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Plasmadaten bei direkter Applikation in das Jejunum (Ligated-Loop-Studien)

Im Rahmen von Ligated-Loop-Studien sollte untersucht werden, ob die zusätzliche intrajejunale Gabe von Eudragit E (15 mg / kg KG) gleichzeitig mit 10 mg / kg KG Tropiumchlorid zu einer Erhöhung der Plasmakonzentrationen von Tropium führt.

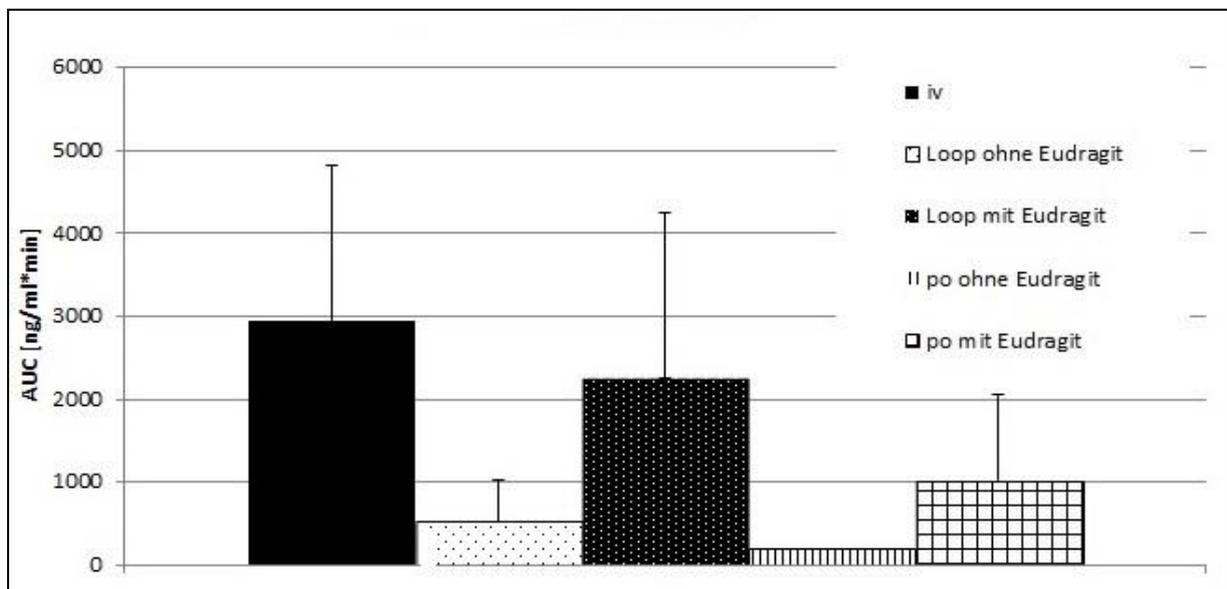
Die erhaltenen Konzentrations-Zeit-Profile erwiesen sich als in ihrem Verlauf heterogen und wiesen in unterschiedlichem Ausmaß Diskontinuitäten auf. Die mithilfe von nichtkompartimenteller Analyse erhaltenen orientierenden AUC-Werte sind in Abbildung 4.1 zusammenfassend dargestellt. Der Zusatz von Eudragit E führte im Mittel zu einer Erhöhung der AUC. Bei Ratten, die Eudragit E erhalten hatten, betrug die durchschnittliche AUC 2264 ng/ml*min, bei der Kontrollgruppe nur 527 ng/ml*min. Die Gabe von Eudragit E beeinflusste auch andere pharmakokinetische Parameter. So betrug nach Gabe von Eudragit E die höchste gemessene Konzentration C_{max} im Schnitt 15,7 ng/ml, während der Wert der Kontrollgruppe um den Faktor 3 niedriger war (5,26 ng/ml). Der Zeitpunkt der höchsten gemessenen Konzentration t_{max} war in der Testgruppe mit 3,6 min deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe (92,2 min). Aufgrund der geringen Anzahl von Tieren und der hohen Datenvariabilität erreichte keiner dieser Unterschiede statistische Signifikanz.

4.3.2. Plasmadaten bei Applikation mit der Schlundsonde

Es sollte zudem untersucht werden, ob die zusätzliche Gabe von Eudragit E zusammen mit Tropiumchlorid per Schlundsonde in den Magen zu einer Erhöhung der Plasmakonzentrationen und der Bioverfügbarkeit von Tropium führt. Es wurden die gleichen Mengen Eudragit E und Tropiumchlorid eingesetzt, die auch in den Ligated-Loop-Studien verwendet worden waren.

Auch bei dieser Behandlung waren die Konzentrations-Zeit-Profile unabhängig von der applizierten Zubereitung variabel und zeigten Diskontinuitäten, die auf einen

multisegmentellen Input hindeuteten. Nach peroraler Gabe von reinem Trosipiumchlorid war nur im Plasma von einer der vier Ratten Trosipium quantifizierbar. Die durchschnittlichen AUC-Werte, die in Abbildung 4.1. zusammenfassend dargestellt sind, unterschieden sich demzufolge sehr deutlich. Der durchschnittliche AUC-Wert für die Testgruppe lag um Faktor 50 höher als für die Kontrollgruppe (Testgruppe: 1020 ng/ml*min; Kontrollgruppe: 47,75 ng/ml*min; $p < 0,05$). C_{max} war in der Testgruppe um etwa den Faktor 10 höher (Kontrollgruppe: 1,05 ng/ml; Testgruppe: 9,96 ng/ml).



Figur 4.1. AUC-Werte aus nichtkompartimenteller Analyse für Trosipium nach Gabe von 1 mg/kg Trosipiumchlorid i.v. (schwarz) bzw. 10 mg/kg p.o. in Ratten: AUC nach intrajejunaler Gabe von 10 mg/kg b.w. Trosipiumchlorid ohne Eudragit E (schwarz gepunktet) und mit 15 mg/kg b.w. Eudragit E (weiße Punkte auf schwarzem Grund) in eine Ligated Loop und die AUC nach peroraler Gabe von 10 mg/kg b.w. Trosipiumchlorid ohne Eudragit E (längs schraffiert) und mit 15 mg/kg b.w. Eudragit E (kariert) per Schlundsonde.

4.3.3. Ergebnisse der kompartmentellen Analyse der Inputparameter mit Mean-times-Analyse

Für alle Datensätze, die nach intravenöser Applikation resultierten, war der Kurvenverlauf biexponentiell und das offene 2-Kompartiment-Modell geeignet. Die Halbwertszeiten für die beiden Dispositionsphasen betragen $0,76 \pm 1,05$ min für die schnelle und $15,0 \pm 5,2$ min für die langsame Dispositionsphase bei einer mittleren Verweilzeit MRT_{tot} von $19,7 \pm 5,59$ min. Als mittlere systemische Clearance wurde ein Wert von 496 ± 351 ml/min berechnet, als Verteilungsvolumen $2,03 \pm 2,26$ l. Die totale MRT setzt sich auch bei i.v.-Gabe aus systemischer mittlerer Verweilzeit und Input zusammen, wobei in diesem Fall der Input resultiert aus der Verteilungszeit im Organismus nach Bolusinjektion (max. 3 min), die MRT betrug bei der i.v.-Studie ca. 20 min. Über den ganzen Datensatz ergab sich eine MRT_{sys} von ca. 40 min.

Die den Input charakterisierenden PK-Ergebnisse aus den Kurvenanpassungen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1. Absorption aus dem GI-Trakt: Inputparameter für Trospium bei Applikation in das Jejunum und Applikation über Schlundsonde ohne und mit Zusatz von Eudragit E

	Loop ohne Eudragit E	Loop mit Eudragit E	p.o. ohne Eudragit E	p.o. mit Eudragit E
MRT_{tot} [min]	250,35 +/- 240,92	102,15 +/- 73,39	252,00 +/- 0,00**	278,50 +/- 98,63
MIT [min]	209,33 +/- 240,95	61,08 +/- 73,44	211,00 +/- 0,00**	247,75 +/- 106,35
AUC_{Modell} [ng/ml*min]	527,25 +/- 508,72	2264,0 +/- 1972,1	47,75 +/- 0,00**	1020,0 +/- 1044,4
1. t_{max} [min] (Modell)	92,24 +/- 116,61	3,63 +/- 1,81	5,71 +/- 0,00**	67,50 +/- 65,97
C_{max} [ng/ml] (Modell)	5,27 +/- 5,60	15,70 +/- 12,98	1,05 +/- 0,00**	9,96 +/- 5,87 *
CL/F [ml/min]	37842 +/- 29204	10610 +/- 9843	52400 +/- 0**	21700 +/- 17514
F_{abs} [%]	1,8 +/- 1,73	7,71 +/- 6,72	0,65 +/- 0,00**	3,48 +/- 3,56
t_{lag,1} [min]	1,75 +/- 3,50	3,31 +/- 1,95	4,87 +/- 0,00**	5,82 +/- 1,31
t_{lag,2} [min]	229,28 +/- 102,64	95,60 +/- 92,47	170,00 +/- 0,00**	134,25 +/- 43,87

Anpassung Disposition: $t_{1/2}(\lambda_1)$ = schnelle Dispositionshalbwertszeit (Mittelwert im Datensatz 3,09 min), $t_{1/2}(\lambda_2)$ = langsame Dispositionshalbwertszeit (Mittelwert für Datensatz 100 min); $MRT_{disp} = 41,1$ min. (* $p < 0,05$)

[Erläuterung der Abkürzungen der Inputparameter: MRT_{tot} mittlere Verweilzeit insgesamt, MIT mittlere Inputzeit (MIT = $MRT_{tot} - MRT_{sys}$), AUC_{Modell} AUC aus biexponentieller Funktion berechnet, t_{max} Zeitpunkt für Peakkonzentration im Plasma in Kurvenanpassung (1. t_{max} = Zeitpunkt für erstes Maximum bei multisegmentellem Input), C_{max} (Modell) berechnete Peakkonzentration im Plasma, $CL/F = Dosis/AUC$ = orale Clearance, F_{abs} absolute Bioverfügbarkeit, t_{lag} lag-Zeit ($t_{lag,1}$ lag-Zeit für das erste Inputsegment bei bisegmentellem Input)

* - $p < 0,05$, ** - Trospiumchlorid war nur bei einer von 4 Ratten im Plasma quantifizierbar

Die C_{max} -Werte aus der Modellanpassung waren jeweils mit Eudragit-Zusatz deutlich höher, nach p.o.-Applikation war die Erhöhung statistisch signifikant (Tab. 4.1) Auch die AUC-Werte betragen im Mittel mit Eudragit ein Mehrfaches der Werte im Kontrollkollektiv. Orale Clearance-Werte lagen mit absorptionsförderndem Hilfsstoff jeweils niedriger, was mit der Erhöhung der -ohne Zusatz geringen- absoluten Bioverfügbarkeit um im Mittel den Faktor 4,5 – 5,5 einhergeht. Tendenziell erhöhte Eudragit die erste lag-Zeit, während im zweiten Segment aufgrund der hohen Variabilität keine eindeutige Aussage möglich war.

Auch die Mean-times-Analyse ergab aufgrund einer hohen Variabilität zwar einen Trend zu einer erhöhten MIT bei Gabe mit Schlundsonde, ließ aber keine eindeutige Schlussfolgerung zu. Zudem war die Absorptionszeit bei intrajejunaler Gabe im Mittel vermindert.

4.3.4. Vergleich der Dispositionsparameter und der Absorptionscharakteristika von Ratte und Mensch

Um die Relevanz der Rattendaten für die klinische Situation besser beurteilen zu können, wurden Plasmadaten aus einer früheren PK-Studie am Menschen herangezogen, bei denen die Ermittlung der absoluten Bioverfügbarkeit im Fokus stand [317].

Der Vergleich der Modellparameter ergab, dass die Dispositionshalbwertszeiten beim Menschen deutlich größer waren als bei der Ratte. Das Verteilungsvolumen V_c betrug beim Menschen 10,7 l, die Clearance 1240 ml/min.

Tabelle 4.2. Vergleich der Disposition Ratte vs. Mensch

	Human	Ratte
$t_{1/2} (\lambda_1)$ [min]	2,77	0,76165
$t_{1/2} (\lambda_2)$ [min]	110,40	15,0
k_{21} [1/min]	0,01365	0,193975
k_{1e} [1/min]	0,115	1,75075
k_{12} [1/min]	0,1275	5,078

$t_{1/2} (\lambda_1$ bzw. $\lambda_2)$ sind die Halbwertszeiten für die schnelle und die langsame Dispositionsphase, die in der bioexponentiellen Funktion durch die Hybridexponenten λ_1 bzw. λ_2 repräsentiert sind. k_{21} , k_{12} und k_{1e} sind Mikrokonstanten, wobei k_{12} die Verteilung von Kompartiment 1 in Kompartiment 2 charakterisiert, k_{12} den reversen Prozess und k_{1e} die Elimination aus Kompartiment 1.

Bei peroraler Gabe zeigte sich beim Menschen eine im Vergleich zur Disposition langsame Absorption mit einer Absorptionshalbwertszeit von 6,6 h.

Die Mean-times-Analyse ergab, dass beim Menschen nach p.o.-Gabe die Gesamt-MRT durch den Input dominiert wird. Bei einer MRT_{tot} von 11,3 h betrug der Anteil des Inputs (MIT) 9,8 h. Zudem musste geschlussfolgert werden, dass beim Menschen – anders als bei der Ratte – der Input bzw. die Absorption bei peroraler Gabe den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Ein Flip-flop-Phänomen konnte demgegenüber bei der Ratte in keinem Fall gefunden werden.

4.4. Diskussion und Fazit

Die Suche nach neuen Hilfsstoffen, mit denen es möglich ist, die intestinale Permeabilität zu erhöhen, steht seit Langem im Fokus der angewandten Forschung. Obwohl es vielversprechende Kandidaten wie Chitosan und dessen Derivate [319] oder mittelkettige Fettsäuren wie Natriumdecanoat (das bereits mehrfach erfolgreich in klinischen Studien getestet wurde [53, 253]) gibt, existiert immer noch ein großes Interesse an geeigneten Kandidaten für den Einsatz in pharmazeutischen Formulierungen.

In vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass mit Hilfe von Eudragit E die Permeabilität schlecht permeabler Substanzen wie Mannitol, Talinolol oder Tropium über Caco-2-Monolayer signifikant erhöht werden kann. Die Erhöhung der Permeabilität ging dabei mit einer Erniedrigung des TEER-Wertes einher [107]. Es ist bekannt, dass Mannitol und Tropium vor allem parazellulär transportiert werden [107, 320]. Aus den Ergebnissen der Caco-2-Studie wurde daher geschlossen, dass Eudragit E in ähnlicher Weise wie andere Methacrylat-Derivate oder SDS mit der Membran interagiert und es so zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität kommt [321, 322]. Der genaue Mechanismus konnte allerdings nicht geklärt werden.

Ziel der aktuellen Studie war es zu überprüfen, ob die erfolgversprechenden Ergebnisse, die in vitro mit dem Caco-2-Modell erzielt werden konnten, auf andere, mukusbildende Systeme in vivo bzw. in situ übertragbar sind. In den Ligated-Loop-Studien war eine klare Tendenz zu höheren C_{max} und AUC-Werten erkennbar, wenn Tropiumchlorid zusammen mit Eudragit E verabreicht wurde. Die Ergebnisse der Applikation via Schlundsonde bestätigten die Resultate der Ligated-Loop-Studien. Statistische Signifikanz wurde aufgrund der hohen Standardabweichungen in beiden Fällen meist nicht erreicht.

Trotz aufgrund der geringen Fallzahl in dieser orientierenden Studie mangelnden bzw. fehlenden statistischen Signifikanz kann die Schlussfolgerung getroffen werden, dass Eudragit E auch in vivo effektiv ist und als Permeationsförderer ein gutes Potenzial beinhaltet bzw. zu haben scheint. Vor dem Einsatz der Substanz in einer klinischen Studie ist jedoch der Mechanismus der Bioverfügbarkeitserhöhung zu evaluieren. Darüber hinaus ist

herauszustellen, dass in den vorliegenden Experimenten eine sehr hohe Trospium-Dosis eingesetzt wurde. Auch die Eudragit-Dosis muss als hoch angesehen werden. Bei Eudragit E handelt es sich zwar um einen zugelassenen Hilfsstoff, und in der FDA-Datenbank für inerte Hilfsstoffe werden mehrere orale Arzneiformen mit Eudragit E aufgeführt, jedoch enthält diejenige orale Arzneiform zur Anwendung beim Menschen, die den höchsten Gehalt an Eudragit E besitzt, nur 33,39 mg des Hilfsstoffes. Die in den hier beschriebenen Experimenten eingesetzte Menge von 15 mg/kg Körpergewicht pro Dosis liegt deutlich höher.

5. Effekt des Permeationsverbesserers Chitosan-Hydrochlorid auf die Absorption von Aciclovir in vitro und in vivo

5.1. Einleitung

Die perorale Gabe einer Arzneiform stellt für den Patienten nach wie vor die bequemste und sicherste Art der Anwendung dar. Das Bestreben der entwickelnden Firmen, einen neuen Wirkstoff in einer peroral zu verabreichenden Form in den Handel zu bringen, ist daher verständlicherweise groß. Biopharmazeutische Probleme bei der peroralen Gabe entstehen bei Wirkstoffen mit geringer Löslichkeit oder schlechter Permeabilität. Während für Wirkstoffe mit geringer Löslichkeit mittlerweile einige Standardtechnologien wie Mikroemulsionspräkonzentrate oder feste Dispersionen verfügbar sind, stellen schlecht permeable Wirkstoffe immer noch ein Problem dar [323]. Besonders Wirkstoffe mit hohem Molekulargewicht oder geladene Wirkstoffe weisen häufig eine niedrige Permeabilität auf.

Bei Aciclovir handelt es sich um einen seit Langem bekannten Wirkstoff, der vor allem topisch zur Behandlung von Lippenherpes eingesetzt wird. Der Wirkstoff wird jedoch auch peroral verabreicht, beispielsweise zur Behandlung von Varizella zoster. Aciclovir weist eine relativ geringe Löslichkeit in wässrigen Medien und eine schlechte Permeabilität auf und wird, je nachdem, ob die höchste erhältliche Einzelgabe in einem Land 400 oder 800 mg beträgt, in die BCS Klasse III oder IV eingeordnet. In der Standardtherapie der Gürtelrose ist eine Gabe von 800 mg Aciclovir 5-mal täglich vorgesehen. Eine solche Therapie ist für den Patienten umständlich und führt, besonders was die nächtliche Gabe angeht, häufig zu einer schlechten Compliance [15]. Durch eine Verbesserung der Permeabilität könnte man mit weniger Wirkstoff auskommen und das Dosierintervall verlängern.

In den letzten Jahren wurden viele Substanzen hinsichtlich ihrer Eigenschaften als Permeationsenhancer untersucht. Zu den viel versprechendsten gehören neben Natriumdecanoat, das mittlerweile in einigen Ländern in Ampicillin-Suppositorien Verwendung findet [253], Chitosan und dessen Derivate [319]. Es gab bereits intensive

Forschung zu Chitosan und Chitosan-Derivaten wie Trimethylchitosan oder Carboxymethylchitosan [83, 89].

Chitosan-HCl stellt ein Derivat dar, das im Vergleich zu reinem Chitosan eine wesentlich bessere Wasserlöslichkeit aufweist. Auch zu Chitosan-HCl wurden bereits mehrere Studien durchgeführt. In einer in-vivo-Studie wurde Ratten intraduodenal Buserelin mit Chitosan-HCl verabreicht. Wenn Buserelin in Puffer verabreicht wurde, der 1,5% Chitosan-HCl enthielt, stieg die Bioverfügbarkeit signifikant von 0,1% auf 5,1% an [79]. In einer in-vitro-Studie im Caco-2-Modell führte Chitosan-HCl bei pH 6,2, jedoch nicht bei pH 7,4, zu einer signifikanten Reduktion des TEER-Wertes und einer Erhöhung der Permeabilität um Faktor 36 [80]. In einer anderen Studie konnte durch eine 1%ige Lösung von Chitosan-HCl in vivo in Ratten jedoch keine Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Octreotid erreicht werden, während Trimethylchitosan die Bioverfügbarkeit um Faktor 5 erhöhte [156].

In dieser Studie sollte die Wirksamkeit von Chitosan-HCl zur Verbesserung der Permeabilität von Aciclovir an 3 verschiedenen Systemen getestet werden. Zum einen sollte die Permeabilitätsverbesserung an Caco-2-Zellen getestet werden, die keinen Mukus bilden. Zum anderen sollte die Permeabilitätsverbesserung mit mukusbildendem Rattendarm im Ussing-Kammer-Modell sowie in-situ- in Ligated-Loop-Studien getestet werden. Die Ergebnisse sollten sowohl die permeabilitätsverbessernden Eigenschaften von Chitosan-HCl als auch über die Fähigkeit der verwendeten Systeme zur Vorhersage der in-vivo-Permeabilität Aufschluss geben.

5.2. Material und Methoden

5.2.1. Materialien

Die Ratten stammten von Charles River in Sulzfeld. Die Caco-2-Zellen stammten aus der European Collection of Cell Cultures. DMEM, HBSS und Penicillin/Streptomycin wurden bei Gibco gekauft. Ketamin (Ketavet, Pfizer) und Xylazin (Rompun, Bayer) wurden von der

Apotheke der Universitätsklinik Mainz bezogen. Die Polycarbonat Transwells stammten von Corning in Amsterdam. Bei Zovirax handelte es sich um das holländische Präparat. Chitosan Hydrochlorid stammte von Heppe Medical Chitosan in Halle. Es wurde die Chitoscience-Qualität verwendet. Alle anderen Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich in Schnelldorf erworben.

5.2.2. Zellkultur

Die Aufzucht der Zellen und der Monolayer erfolgte, wie in 2.1.6 beschrieben.

5.2.3. Caco-2-Transport-Experimente

Alle Donor-Lösungen wurden in 250 ml Donor-Puffer hergestellt. Die Transportexperimente wurden alle apikal nach basolateral durchgeführt.

Die Mannitol/Propranolol-Referenzlösung enthielt 0,1 mM Mannitol und 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -Mannitol sowie 0,1 mM Propranolol und 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Propranolol. In einer Versuchsreihe wurden dieser Referenzlösung 1,6 g/l Chitosan-HCl zugesetzt, in einer anderen Versuchsreihe 4,0 g/l Chitosan-HCl.

Die Zovirax Referenzlösung enthielt eine Zovirax 200 Tablette, welche 200 mg Aciclovir in 250 ml Donor-Puffer beinhaltete. In einer Versuchsreihe wurden dieser Referenzlösung 1,6 g/l Chitosan-HCl zugesetzt, in einer anderen Versuchsreihe 4,0 g/l Chitosan-HCl.

Von der Donor Seite wurden nach 0 und 120 Minuten Proben genommen. Von der Akzeptor-Seite wurden nach 0, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten Proben entnommen.

Ansonsten waren die Versuchsbedingungen identisch mit denen, die unter 2.2.7 beschrieben wurden.

5.2.4. Präparation des Rattengewebes

Die Entnahme und Präparation des Rattengewebes erfolgte wie unter 2.2.8 beschrieben.

5.2.5. Ussing-Kammer-Transport-Experimente

In allen Versuchen wurde dem Donor Puffer 0,8 g/l Aciclovir zugesetzt. In verschiedenen Versuchsreihen enthielt der Donor Puffer außerdem 1,6 g/l, 4 g/l, 10 g/l, 30 g/l oder 50 g/l Chitosan-HCl. Der pH des Donor-Puffers wurde bei allen Versuchen auf 6,0 eingestellt. Ansonsten waren die Bedingungen identisch mit den unter 2.2.10 beschriebenen.

5.2.6. Loop-Studien bei Ratten

In allen Experimenten wurde den Ratten eine Lösung von 0,8 g/l Aciclovir verabreicht. In verschiedenen Versuchsreihen enthielt die Lösung außerdem 4 g/l oder 50 g/l Chitosan-HCl.

Ansonsten waren die Bedingungen identisch mit den unter 2.2.5 beschriebenen.

5.2.7. Analytische Methoden

Proben aus Ussing-Kammer-Studien

Die Konzentration von Aciclovir aus den Zellexperimenten und aus den Ussing-Kammer Experimenten wurde mittels HPLC ermittelt. Es wurde ein isokratisches System und eine UV Detektion bei 254 nm angewandt. Die mobile Phase bestand aus 10 mM Essigsäure und Acetonitril im Verhältnis 95:5. Es wurde eine reversed-phase C-18 Säule benutzt (Lichrospher 100 RP 18e, 250-4, 5µm, Merck, Darmstadt). Die Retentionszeit von Aciclovir

betrug 4,6 min. Proben von 50 µl wurden injiziert. Für beide Analysen betrug die Laufzeit 5 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min.

Proben aus Ligated-Loop-Studien

Die Konzentration von Aciclovir aus den Ligated-Loop-Studien wurde mit Hilfe von LC-MS-MS-Analytik ermittelt. Dazu wurde ein Agilent 1100 HPLC-System verwendet, das an ein API 3000 Massenspektrometer angeschlossen war. Eine C-18 Säule wurde benutzt (Prontosil 100-5-C18, Aq Plus Partikelgröße 5,0µm). Der interne Standard bestand aus Ganciclovir gelöst in 0,1 N HCl. 50 µl Rattenplasma wurden mit 5 µl internem Standard, 10 µl 0,1 N HCl und 150 µl Acetonitril mit einem Vortex gemischt und danach 30 min bei 14000 rpm und -5°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Analytik weiter verwendet. Die Abtrennung von Aciclovir erfolgte mit einer Gradientenmethode. Die mobile Phase bestand aus einer Lösung von 15 mM/l Ammoniumacetat mit 0,275% Ameisensäure (50%) in bidestilliertem Wasser, eingestellt auf einen pH von 3,5 (A) und Acetonitril mit 0,275% Ameisensäure (50%) (B) in unterschiedlichen Mengen. Folgender Gradient wurde verwendet:

0 - 0,1 min	300 µl/min	97 % A	3 % B
0,1 - 0,5 min	300 µl/min	97 % A	3 % B
0,5 - 0,6 min	300 µl/min	5 % A	95 % B
0,6 - 1,2 min	300 µl/min	5 % A	95 % B
1,2 - 2,0 min	300 µl/min	97 % A	3 % B
2,0 - 5,5 min	300 µl/min	97 % A	3 % B

Multiples Reaktions-Monitoring wurde mit den Übergängen Q_1/Q_3 : 255,992→ 151,873 durchgeführt. Die Laufzeit betrug 5,5 Minuten. Die Quelltemperatur lag bei 500°C. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl. Das Detektionsminimum lag bei 1 ng/ml.

5.2.8. Berechnung der apparenten Permeabilität

Die Berechnung der apparenten Permeabilität erfolgte anhand der Formel

$$P_{app} = (dC_r/dt) * [V_r/(A * C_d)]$$

Erklärung der verschiedenen Parameter:

dC_r/dt stellt die Konzentration an Aciclovir pro Zeiteinheit im Akzeptorkompartiment in $\mu\text{g/ml} * \text{s}$, bzw. in $\text{dpm/ml} * \text{s}$ dar.

V_r ist das Volumen im Akzeptorkompartiment in ml.

A ist die Fläche des Monolayers ($1,13 \text{ cm}^2$ für 12 Transwells).

C_d ist die Konzentration im Donor-Kompartiment zu Beginn eines entsprechenden Zeitintervalls in $\mu\text{g/ml}$.

5.2.9. Berechnung der pharmakokinetischen Parameter

Die AUC wurde unter Annahme eines offenen 2-Kompartiment Modells mit Topfit (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart) ermittelt.

5.2.10. Statistische Methoden

Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test bei einer statistischen Sicherheit von 95% durchgeführt. P-Werte unterhalb von 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

5.3. Ergebnisse

5.3.1. Caco-2-Transport-Experimente

Es wurde untersucht, ob der Zusatz von Chitosan-HCl in den Konzentrationen 1,6 g/l oder 4 g/l Einfluss auf die apikale nach basolaterale Permeabilität von 0,8 g/l Zovirax, 0,1 mM Mannitol und 0,1 mM Propranolol über einen Caco-2-Monolayer hat.

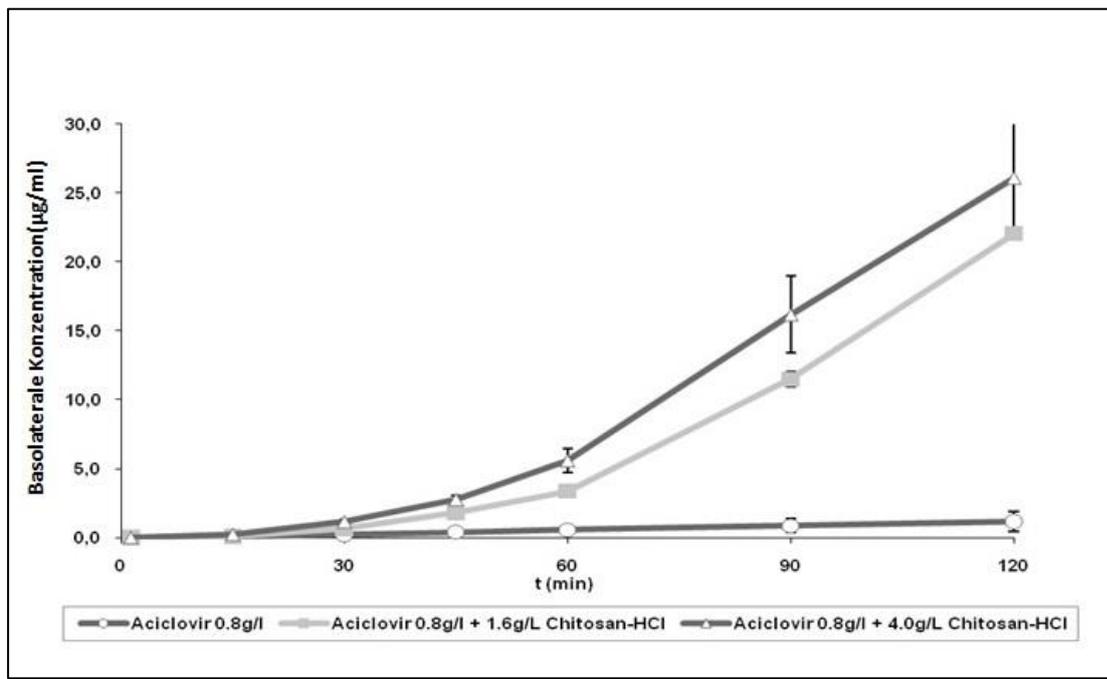
Die Ergebnisse der Permeationsexperimente sind in Tabelle 5.1. zusammengestellt. Es ist zu sehen, dass die P_{app} von Aciclovir durch Chitosan-HCl konzentrationsabhängig erhöht wurde. Bereits eine Konzentration von 1,6 g/l löste dabei einen signifikanten Effekt aus. 1,6 g/l Chitosan-HCl führten zu einer Steigerung um ca. Faktor 16, 4 g/l Chitosan-HCl führten zu einer im Vergleich zur niedrigeren Konzentration signifikant höheren Steigerung um ca. Faktor 23. Durch Chitosan-HCl wird auch die P_{app} von Mannitol gesteigert. 1,6 g/l Chitosan bewirkten eine signifikante Steigerung der Permeabilität. Eine Erhöhung der Chitosan-Konzentration auf 4 g/l führte zu keiner weiteren Erhöhung der Permeabilität. Chitosan-HCl führt in beiden verwendeten Konzentrationen zu einer Steigerung um etwa Faktor 3.

Im Gegensatz zu Mannitol und Aciclovir führt der Zusatz von Chitosan-HCl bei Propranolol zu einer leichten Senkung der apparenten Permeabilität. Die Unterschiede erreichen nur bei Vergleich der Referenzlösung mit der höheren Chitosan-Konzentration statistische Signifikanz.

Tabelle 5.1. Einfluss von 1,6 g/l, bzw. 4 g/l Chitosan-HCl auf die apparente Permeabilität von Zovirax, Mannitol und Propranolol apikal nach basolateral über einen Caco-2-Monolayer

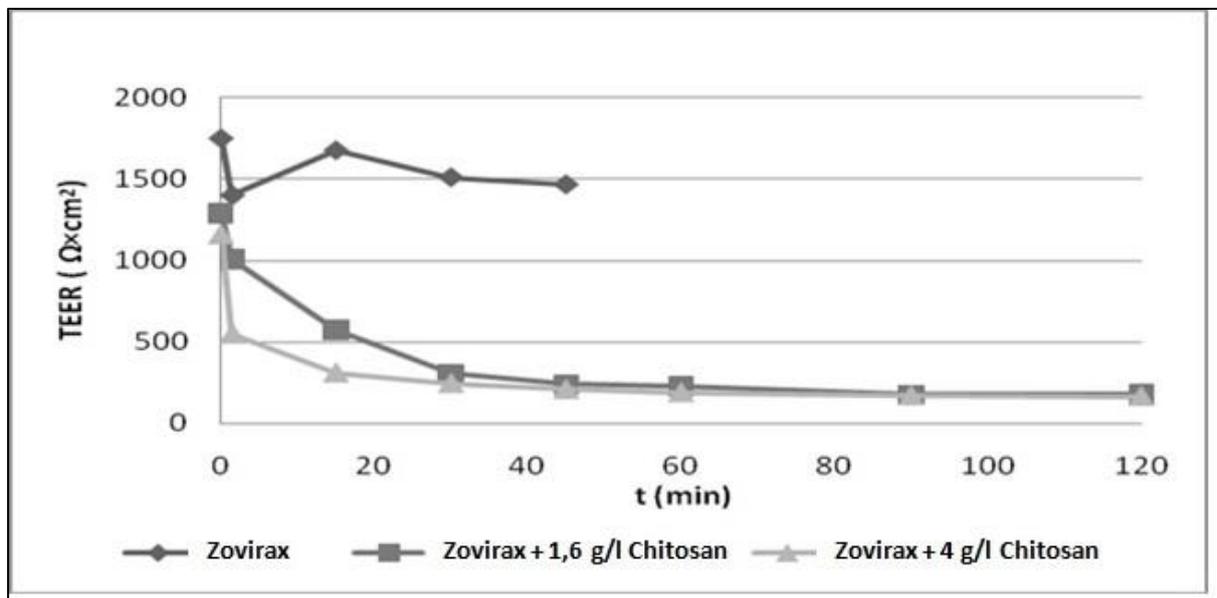
	Zovirax (n=3)			Mannitol (n=6)			Propranolol (n=6)		
	Referenz-lösung	Chitosan 1,6 g/l	Chitosan 4,0 g/l	Referenz-lösung	Chitosan 1,6 g/l	Chitosan 4,0 g/l	Referenz-lösung	Chitosan 1,6 g/l	Chitosan 4,0 g/l
MW									
P_{app}	0,35	5,70	8,00	1,32	4,03	4,02	17,20	14,60	12,50
SD	0,22	0,16	1,10	0,67	1,18	1,76	1,42	0,78	0,42

In Figur 5.1 ist die Aciclovir-Konzentration im Akzeptor-Kompartiment gegen die Zeit dargestellt. Man kann erkennen, dass der Effekt des Chitosan-HCl erst nach ca. 45 Minuten ausgeprägt zu erkennen ist. Ab diesem Zeitpunkt besteht zwischen beiden Chitosan-haltigen Lösungen und der Referenzlösung ein statistisch signifikanter Unterschied. Der Anstieg ist bei Verwendung der höheren Konzentration deutlicher.



Figur 5.1. (übernommen und abgeändert von Marlies Kubbinga) Vergleich der apikalen nach basolateralen Permeation von 0,8 g/l Aciclovir (○), 0,8 g/l Aciclovir + 1,6 g/l Chitosan-HCl (■) und 0,8 g/l Aciclovir + 4 g/l Chitosan-HCl (Δ) in einem Zeitraum von 120 min über einen Caco-2-Monolayer. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 Messungen.

Figur 5.2. zeigt die Entwicklung des TEER-Wertes des Caco-2-Monolayers in den 120 Minuten nach Zugabe der Prüflösungen, die in je einer der Lösungen gemessen wurde. Man kann erkennen, dass sich der TEER-Wert bei der Kontrolllösung nach einem anfänglichen Abfall schnell wieder erholt und nach 50 Minuten im Vergleich zum Ursprungswert nur um etwa 15 % gesunken ist. Nach Zugabe beider Chitosan-HCl Konzentrationen fällt der TEER-Wert hingegen rapide ab. Dieser Abfall geschieht nach Zugabe der höheren Konzentration noch schneller. Nach 120 Minuten ist der TEER-Wert im Vergleich zum Ursprungswert um mehr als 80 % gefallen.

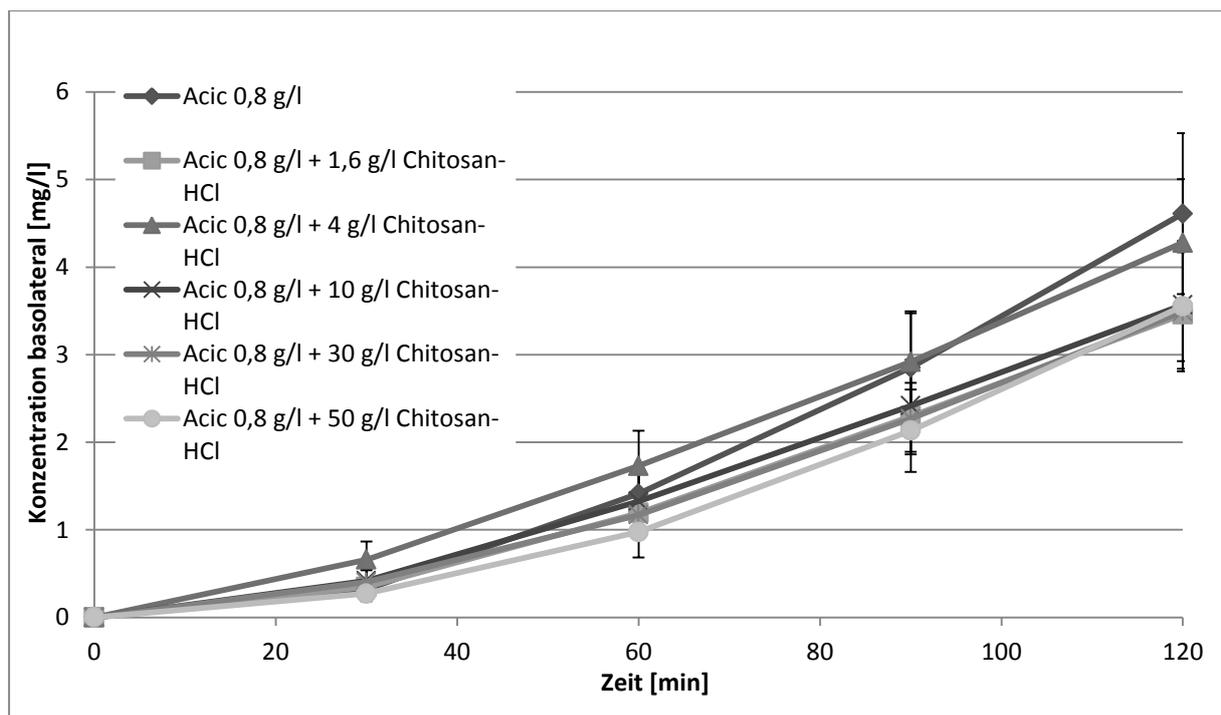


Figur 5.2. (übernommen und abgeändert von Marlies Kubbinga) Vergleich der Reduktion des TEER-Wertes eines Caco-2-Monolayers über einen Zeitraum von 120 Minuten durch 0,8 g/l Zovirax (◆), 0,8 g/l Zovirax + 1,6 g/l Chitosan-HCl (■) und 0,8 g/l Zovirax + 4 g/l Chitosan-HCl (▲). Der Monolayer der Zovirax-Lösung wurde nach 60 Minuten beschädigt.

5.3.2. Ussing-Kammer Transport-Experimente

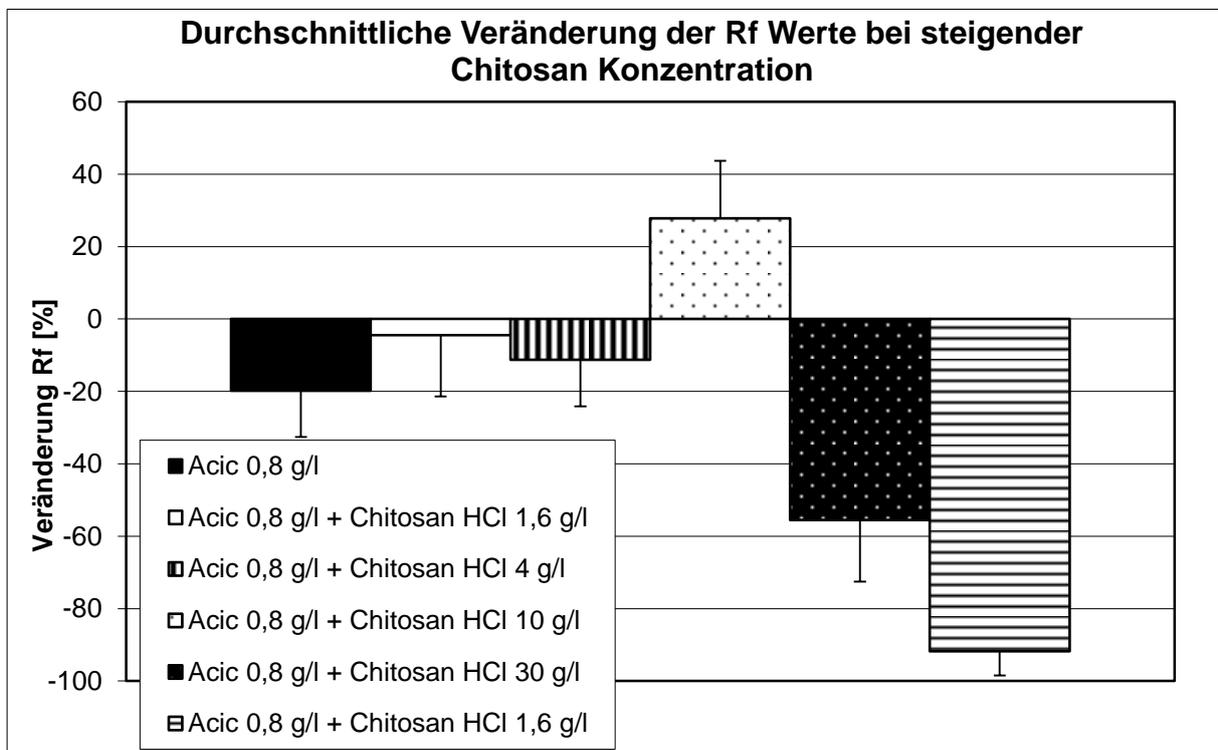
Da eine Interaktion von Chitosan mit Mukus beschrieben wurde, sollten die Ergebnisse, die mit Caco-2-Zellen erhalten wurden, mit Mukus bildendem Rattenjejenum in der Ussing-Kammer überprüft werden.

Die Ergebnisse der Permeationsexperimente in der Ussing-Kammer sind in Figur 5.3. dargestellt. Man kann erkennen, dass der Zusatz von Chitosan-HCl in der Ussing-Kammer im Gegensatz zum Caco-2-Modell nicht zu einer Verbesserung der Permeation von Aciclovir führt. Nach Zusatz von Chitosan-HCl ist eher eine Tendenz zu schlechterer Permeation erkennbar. Allerdings haben die Unterschiede keine statistische Signifikanz.



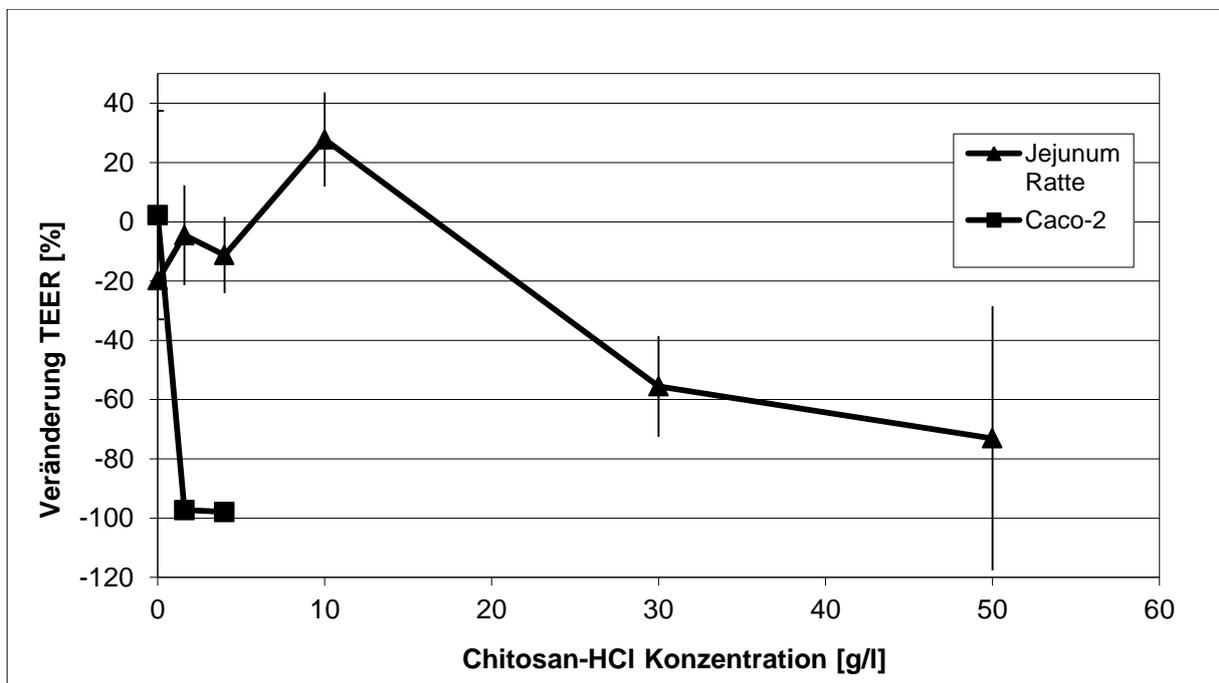
Figur 5.3. Vergleich der apikalen nach basolateralen Permeation von 0,8 g/l Aciclovir (◆), 0,8 g/l Aciclovir + 1,6 g/l Chitosan-HCl (■), 0,8 g/l Aciclovir + 4g/l Chitosan-HCl (▲), 0,8 g/l Aciclovir + 10 g/l Chitosan-HCl (X), 0,8 g/l Aciclovir + 30 g/l Chitosan-HCl (*) und 0,8 g/l Aciclovir + 50 g/l Chitosan-HCl (●) über in einer modifizierten Ussing-Kammer eingespanntes Rattenjejenum. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 5 Messungen.

Figur 5.4. zeigt die Veränderung des transepithelialen Widerstands des Rattengewebes nach 120 Minuten. Der Zusatz von 1,6 g/l und 4 g/l Chitosan-HCl führt zu einem im Vergleich zur Kontrolle geringeren Abfall des Widerstandes. Der Zusatz von 10 g/l Chitosan-HCl führt im Vergleich zum Ursprungswert zu einer Steigerung des Widerstandes um etwa 25 %. Der Zusatz von 30 g/l Chitosan-HCl führt hingegen zu einem Abfall des transepithelialen Widerstandes um fast 60 %, also zu einem im Vergleich zur Kontrolle um Faktor 3 erhöhten Abfall. Der Zusatz von 50 g/l Chitosan-HCl führt im Vergleich zum Ursprungswert sogar zu einem Abfall des Widerstandes um 90%. Nur bei Zusatz von 30 und 50 g/l Chitosan-HCl ist die Reduktion des Widerstandes im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant unterschiedlich.



Figur 5.4. Vergleich der Reduktion des transepithelialen Widerstandes von in einer Ussing-Kammer eingespanntem Rattenejunum nach 2 Stunden durch 0,8 g/l Aciclovir (schwarz), 0,8 g/l Aciclovir + 1,6 g/l Chitosan-HCl (grau), 0,8 g/l Aciclovir + 4 g/l Chitosan-HCl (längs gestreift), 0,8 g/l Aciclovir + 10 g/l Chitosan-HCl (schwarze Punkte), 0,8 g/l Aciclovir + 30 g/l Chitosan-HCl (weiße Punkte) und 0,8 g/l Aciclovir + 50 g/l Chitosan-HCl (quer gestreift). Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichungen aus 5 Messungen.

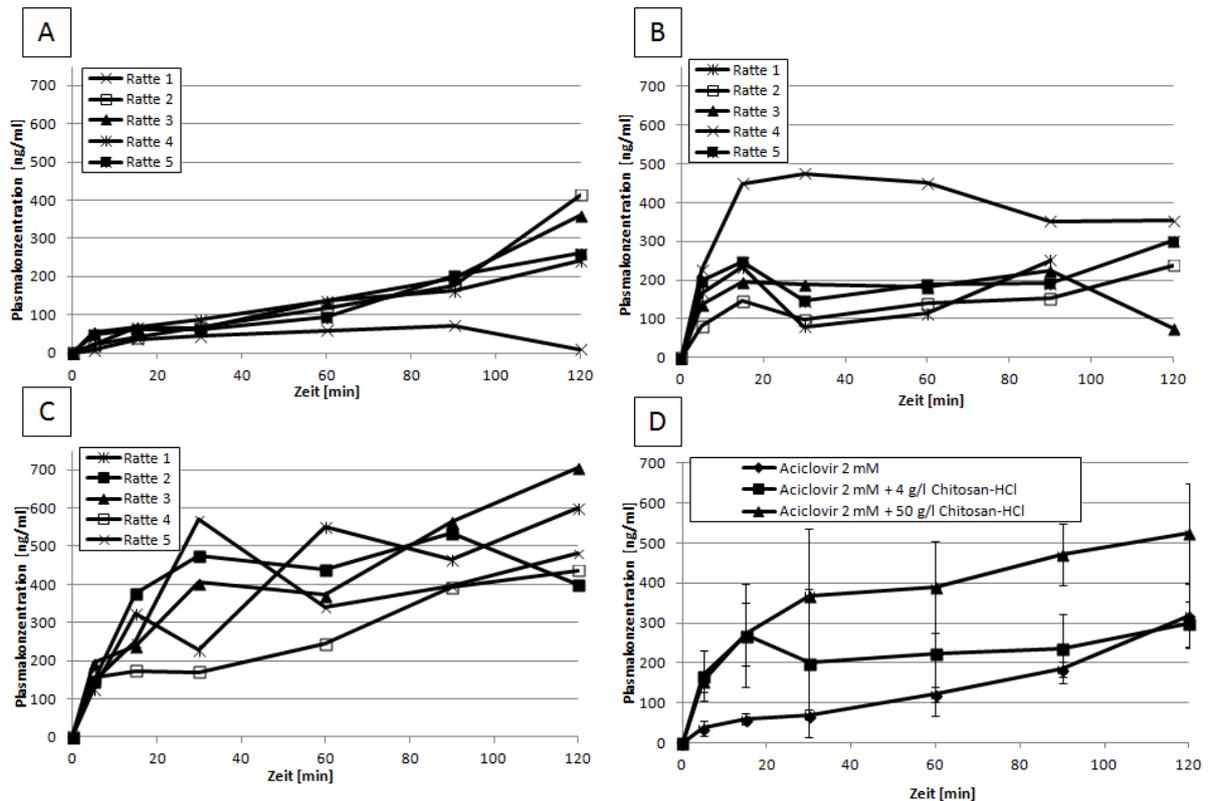
Figur 5.5. zeigt einen Vergleich der Reduktion des transepithelialen Widerstandes, der durch verschiedene Konzentrationen Chitosan-HCl bei einem Caco-2-Monolayer, bzw. bei in der Ussing-Kammer eingespanntem Rattenjejunum nach 120 Minuten Inkubationszeit bewirkt wird. 1,6 g/l Chitosan-HCl führen zu einer nahezu vollständigen Reduktion des TEER-Wertes beim Caco-2-Monolayer. In der Ussing-Kammer sind Konzentrationen von 30 g/l notwendig, um eine signifikante Reduktion des TEER-Wertes zu erreichen. Durch die höchste eingesetzte Konzentration von 50 g/l Chitosan-HCl wird beim Rattenjejunum eine Reduktion des TEER Wertes um ca. 70% bewirkt.



Figur 5.5. Vergleich der Reduktion des transepithelialen Widerstandes von in einer Ussing-Kammer eingespanntem Rattenjejunum (▲) und von einem Caco-2-Monolayer (■) nach 2 Stunden durch steigende Konzentrationen an Chitosan-HCl. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 (Caco-2), bzw, 5 (Ussing-Kammer) Messungen.

5.3.3. Ligated-Loop-Studien

Ein weiteres Modell, in dem die Wirkung von Chitosan-HCl untersucht wurde, ist das Ligated-Loop-Modell, in dem die Wirksamkeit des Permeationsenhancers in situ im lebenden Tier untersucht werden sollte. In Figur 5.6. werden die Aciclovir-Plasmakonzentrationskurven nach intrajejunaler Applikation von Aciclovir alleine und nach kombinierter Gabe mit 4 bzw. 50 g/l Chitosan-HCl gezeigt. Die relativ hohen interindividuellen Abweichungen sind bei Loop-Studien zu erwarten und akzeptabel, da es zwischen den einzelnen Tieren selbstverständlich physiologische Unterschiede gibt und da die Operationen niemals vollständig identisch ablaufen (benötigte Menge Narkosemittel, physiologische Besonderheiten der einzelnen Tiere etc.). Die Kurven nach kombinierter Gabe mit 4 g/l Chitosan-HCl zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe einen etwas stärkeren Anstieg der Konzentration in den ersten Minuten. Die Endkonzentrationen unterscheiden sich jedoch nicht von denen der Kontrollgruppe. Nach kombinierter Gabe mit 50 g/l ist eine deutliche Tendenz zu schnellerem Anstieg der Plasmakonzentration und deutlichen höheren Endkonzentrationen zu erkennen. Statistische Signifikanz wird allerdings nicht erreicht.



Figur 5.6. Aciclovir-Plasmakonzentrationen in Ratten nach intrajejunaler Applikation von jeweils 1 ml Lösung mit 0,8 g/l Aciclovir (A), 0,8 g/l Aciclovir + 4 g/l Chitosan-HCl (B) und 0,8 g/l Aciclovir + 50 g/l Chitosan-HCl (C) im Rahmen von Ligated-Loop-Studien. Die Mittelwertskurven aus den jeweiligen Einzelmessungen (n=5) +/- Standardabweichungen sind ebenfalls dargestellt (D).

5.4. Diskussion und Fazit

Chitosan und Chitosan-Derivate gehören hinsichtlich ihrer Eigenschaften als Permeationsenhancer zu den am besten untersuchten pharmazeutischen Hilfsstoffen [77, 79, 324]. Der Wirkmechanismus von Chitosan als Permeationsverbesserer konnte in verschiedenen Studien ebenfalls aufgeklärt werden [145-149]. Auch viele Chitosan-Derivate sind bereits detailliert erforscht worden. Trimethylchitosan für kationische und neutrale Wirkstoffe sowie Carboxymethylchitosan für anionische Wirkstoffe gehören dabei zu den für den potenziellen Einsatz am Menschen viel versprechendsten Derivaten [83, 157, 158, 283].

Mit verschiedenen in-vitro- bzw. in-situ-Modellen konnten unterschiedlich gute Wirksamkeiten für Chitosan und seine Abkömmlinge gezeigt werden, was unter anderem mit den Eigenschaften der einzelnen Modelle begründet werden kann [78, 79, 91, 149, 250, 267]. Caco-2-Modelle bilden keinen Mukus und reagieren auch aufgrund der fehlenden Schutzschicht, sehr sensitiv auf externe Reize [325]. Im Ussing-Kammer-Modell mit Rattenjejenum wird vom Gewebe Mukus gebildet, jedoch steht nur eine sehr geringe absorptive Oberfläche zur Verfügung und im Gegensatz zur Situation in vivo werden die submukosalen Schichten nicht durchblutet, was zu unphysiologischen Absorptionsprozessen führen kann [276]. Ligated-Loop-Studien reflektieren ebenfalls nur eine Momentaufnahme der in-vivo-Situation. Die Wirkstofflösung wird dabei länger in einem bestimmten Bereich des Darmes gehalten, als dies in vivo der Fall wäre. Darüber hinaus können sich die Absorption von Wirkstoffen im Wachzustand und in Narkose unterscheiden [326, 327].

In einigen früheren Studien wurde Chitosan-HCl als wirksam, in anderen als unwirksam beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass durch Chitosan-HCl die Bioverfügbarkeit von Buserelin nach intraduodener Gabe in Ratten deutlich verbessert werden kann [81]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass durch Chitosan-HCl der Transport von ¹⁴C-Mannitol über einen Caco-2-Monolayer bei pH 6,2 deutlich erhöht werden kann [81]. Chitosan-HCl zeigte jedoch, im Gegensatz zu Trimethylchitosan, keinen Effekt auf die Bioverfügbarkeit von Octreotid nach intrajejunaler Applikation in Ratten [156]. Ziel dieser Studie war es, die Wirksamkeit von Chitosan-HCl im Caco-2-Zell-Modell, im Ussing-Kammer-Modell mit Rattenjejenum und in Ligated-Loop-Studien zu testen und die Ergebnisse der einzelnen Modelle kritisch gegenüber zu stellen [79, 80, 84].

Durch die Transport-Experimente über Caco-2-Zellen konnte gezeigt werden, dass Chitosan-HCl die apparente Permeabilität von Aciclovir konzentrationsabhängig erhöht. Bei Beobachtung der Konzentration im Akzeptor-Kompartiment gegen die Zeit war zu erkennen, dass der permeationserhöhende Effekt nach 60 Minuten Inkubationszeit ausgeprägter wird. Die apparente Permeabilität von Mannitol konnte ebenfalls erhöht werden, während die Permeabilität von Propranolol durch Zusatz von Chitosan-HCl leicht zurück ging. Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass Chitosan seine Wirkung über die Öffnung von tight junctions entfaltet [148]. Die wesentlich stärker ausgeprägte Reduktion des TEER-Wertes in

Gegenwart von Chitosan-HCl in den Caco-2-Studien, steht in Einklang mit dieser These. So ist es vermutlich zu erklären, dass die Permeabilität von Aciclovir und Mannitol, die beide primär parazellulär transportiert werden, in Gegenwart von Chitosan-HCl, also bei geöffneten tight junctions ansteigt, während keine Steigerung der Permeabilität des primär transzellulär transportierten Propranolol zu erkennen ist [328-330]. Der leichte Rückgang der Permeabilität von Propranolol in Gegenwart von Chitosan ist jedoch schwer zu erklären.

Der im Caco-2-Modell beobachtete permeationserhöhende Effekt konnte im Ussing-Kammer-Modell nicht bestätigt werden. In Gegenwart von Chitosan-HCl zeigte sich eher eine leichte, wenn auch nicht signifikante Tendenz zu geringerer Permeation. Eine mögliche Erklärung liefern frühere Studien, in denen eine Bindung von Chitosans an intestinalen Mukus beschrieben wird. Wenn die positiven Ladungen des Chitosan durch Mukus neutralisiert werden, ist eine Interaktion von Chitosan mit der intestinalen Membran nicht mehr möglich. Darüber hinaus könnte es zu Quervernetzungen des Mukus kommen, was zu einer Stabilisierung der Mukus-Schicht führen könnte [146, 147].

Die Werte des transepithelialen Widerstandes waren bei Einsatz geringer Konzentrationen an Chitosan-HCl im Vergleich zur Kontrolle nahezu unverändert. Erst bei Verwendung von 30 bzw. 50 g/l Chitosan-HCl kam es zu einem deutlichen, konzentrationsabhängigen Abfall der TEER-Werte. Auch diese Beobachtung könnte damit begründet werden, dass es durch die Bindung von Chitosan an Mukus zunächst zu einer Stabilisierung der Mukusschicht kommt, während bei höheren Konzentrationen die Ladungen am Mukus neutralisiert sind und eine Interaktion des Chitosans mit der Membran stattfindet, die zur Öffnung von tight junctions führt.

In den Loop-Studien waren bei Einsatz von 4 g/l Chitosan-HCl keine klaren Unterschiede in den Aciclovir-Plasmakonzentrationen auszumachen, während es bei Einsatz von 50 g/l eine deutliche Tendenz zu höheren Plasmakonzentrationen gab. Durch die Präparation des Darms für die Ussing-Kammer und dessen Einsatz in gekühltem Puffer kommt es zu einer stärkeren Mukus-Bildung. Die hierdurch bedingte größere Menge an Mukus pro Oberfläche stellt eine mögliche Erklärung für dieses von den Beobachtungen im Ussing-Kammer-Modell abweichende Ergebnis dar [276].

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Unterschiede der verschiedenen Modelle einen deutlichen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Ein Untersuchungsmodell für einen Permeationsenhancer sollte daher abhängig von dessen physikochemischen Eigenschaften gewählt werden. Da es bei Chitosan-HCl wahrscheinlich zu einer Interaktion mit intestinalem Mukus kommt, besitzen die Ergebnisse aus dem Ussing-Kammer, bzw. dem Loop-Modell wohl die höhere Aussagekraft für die Vorhersage der Wirksamkeit in vivo im Menschen. Eine Wirksamkeit von Chitosan-HCl in vivo mutet demzufolge unwahrscheinlich an.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte der Effekt verschiedener pharmazeutischer Hilfsstoffe auf die Permeabilität von Wirkstoffen der BCS Klasse III anhand verschiedener in-vitro- und in-vivo-Modelle untersucht werden. Die Substanzen λ -Carrageen, Eudragit E und Chitosan-HCl wurden hinsichtlich der Möglichkeit ihres Einsatzes als permeationsverbessernde Hilfsstoffe in pharmazeutischen Formulierungen untersucht. Darüber hinaus wurde die physiologische Funktion körpereigener Gallensalze, die in anderen Arbeiten bereits als permeationsverbessernde Hilfsstoffe eingesetzt wurden, bei der Resorption von Trosipium untersucht.

Durch Layer-by-Layer-Technologie wurden Komplexe aus Trosipium und λ -Carrageen hergestellt. Diese Komplexe wurden Ratten einmal per Schlundsonde und einmal intrajejunal im Rahmen von Ligated-Loop-Studien verabreicht. Die Plasmakonzentrationen der Ratten zeigten in beiden Fällen hohe Standardabweichungen, bei einigen Tieren konnten jedoch nach Verabreichung der Komplexe Plasmakonzentrationen erreicht werden, die im Vergleich zur Kontrolle um bis zum Faktor 60 erhöht waren. Im Caco-2-Modell konnte durch Einsatz der Komplexe keine Steigerung der Permeation von Trosipium erreicht werden. Im Ussing-Kammer-Modell konnte durch Einsatz des Komplexes eine signifikante Steigerung der Permeation von Trosipium über isoliertes Rattenjejunum erreicht werden, wenn der Komplex direkt auf die Membran aufgebracht wurde. Wurde der Komplex jedoch in der Donorlösung gelöst oder suspendiert oder wurde nur λ -Carrageen auf die Membran aufgebracht, verbesserte sich die Permeation von Trosipium nicht. Eine Verbesserung der Permeation bei direktem Auftragen des Komplexes auf die Membran konnte auch mit den Wirkstoffen Atenolol und Butylscopolamin erreicht werden. Es wurde geschlossen, dass die Permeationsverbesserung durch Mukoadhäsion zustande kommt und somit das Vorhandensein des intestinalen Mukus voraussetzt. Durch die Bindung des Wirkstoffes an Mukus entsteht ein starkes Konzentrationsgefälle an der Membran. Ein direkter, enger Kontakt des Komplexes mit der Membran ohne vorherige Hydrierung des Komplexes ist Voraussetzung für den beobachteten Effekt. Dadurch sind auch die starken Abweichungen in den Ligated-Loop- und den in-vivo-Studien zu erklären.

Eine mögliche Beteiligung von Gallensalzen am negativen Nahrungsmiteleinfluss bei Gabe von Trospium ist im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht worden. Es wurde in der Vergangenheit wiederholt demonstriert, dass durch Gallensalze die Permeation bestimmter Wirkstoffe verbessert werden kann. Eine Interaktion zwischen Gallensalzen und quartären Ammoniumverbindungen konnte auch bereits gezeigt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen von Gallensalzen im Intestinaltrakt im nüchternen und im postprandialen Zustand schien daher deren Beteiligung am negativen Food-Effekt von Trospium möglich. Mittels isothermaler Titrationskalorimetrie konnte eine Reaktion von Trospium mit den Gallensalzen GCDC und TCDC, wahrscheinlich in Form einer Ionenpaarbildung und einer hydrophoben Interaktion nachgewiesen werden. Gallensalzgemische von Schwein und Rind führten beide zu einer Erhöhung des n-Octanol/Phosphatpuffer-Verteilungskoeffizienten von Trospium. Der Zusatz von TDOC führte im Caco-2-Modell zu einer Steigerung der Permeation von Trospium um Faktor 1,7. Der Zusatz von TDOC oder GCDC führte im Ussing-Kammer-Modell zu einer Verbesserung der Permeabilität von Trospium, wobei TDOC effektiver war. Im Ussing-Kammer-Modell führte das Emulgieren von Olivenöl, welches die physiologische Situation im fed state nachahmen sollte, zu einer kompletten Extinktion des durch die Gallensalze ausgelösten permeationsfördernden Effektes. Es wurde geschlussfolgert, dass die Gallensalze im fed state, obwohl diese dann in höherer Konzentration vorliegen, nicht für die Ionenpaarbildung mit Trospium zur Verfügung stehen und es als Folge zu einer niedrigeren Permeation von Trospium nach Nahrungsaufnahme kommt. Eine Beteiligung der Interaktion von Trospiumchlorid und Gallensalzen am Food-Effekt kann auf Basis dieser Ergebnisse als wahrscheinlich gelten.

Im Caco-2-Modell konnte bereits eine Verbesserung der Permeabilität von Trospium durch Zusatz von Eudragit E gezeigt werden. In dieser Arbeit sollte die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Modelle untersucht werden. Der Zusatz von Eudragit E führte nach intrajejunaler Applikation von Trospiumchlorid im Rahmen von Ligated-Loop-Studien zu signifikant höheren AUC-Werten. Auch nach Schlundsondierungen von Trospiumchlorid konnten bei gleichzeitiger Applikation von Eudragit E signifikant höhere AUC-Werte gemessen werden. Die positiven Ergebnisse der Caco-2-Studien konnten somit bestätigt werden. In der FDA Datenbank für inerte Hilfsstoffe werden mehrere orale Arzneiformen mit

Eudragit E genannt. Die orale Arzneiform, die den größten Gehalt an Eudragit E besitzt, enthält 33,39 mg des Hilfsstoffes. Die in unseren Experimenten eingesetzte Konzentration von 15 mg/kg Körpergewicht liegt deutlich höher. Darüber hinaus muss festgehalten werden, dass der Mechanismus, über den die Permeationsverbesserung zustande kommt, noch geklärt werden muss.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte eine mögliche Permeationsverbesserung von Aciclovir durch Zusatz von Chitosan-HCl anhand verschiedener Modelle getestet werden. Frühere Ergebnisse zu den permeationserhöhenden Eigenschaften von Chitosan-HCl waren je nach Versuchsreihe und verwendetem Wirkstoff widersprüchlich. So wurde nach intrajejunaler Gabe in Ratten eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Buserelin beschrieben, allerdings konnte die Bioverfügbarkeit von Octreotid nicht verbessert werden. In unseren Versuchen konnte im Caco-2-Modell durch Zusatz von 4 g/l Chitosan-HCl eine Verbesserung der Permeation von Aciclovir um den Faktor 26 erreicht werden. Im Ussing-Kammer-Modell war bei Einsatz von Konzentrationen von mehr als 30 g/l Chitosan-HCl zwar ein deutlicher Rückgang des TEER-Wertes festzustellen, jedoch kam es zu keiner Verbesserung der Permeation von Aciclovir. In Ligated-Loop-Studien führten 4 g/l Chitosan-HCl zu keiner Verbesserung der Aciclovir-Permeation. Bei Einsatz von 50 g/l Chitosan-HCl kam es zu tendenziell höheren Plasmakonzentrationen. Die Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Es kann geschlossen werden, dass das Modell, mit dem eine Permeationsverbesserung untersucht wird, eine wichtige Rolle spielt. Es ist bekannt, dass Chitosan-HCl mit intestinalem Mukus interagiert. Die Ergebnisse aus dem Ussing-Kammer-Modell und dem Ligated-Loop-Modell dürften somit eine höhere Aussagekraft bei der Vorhersage des in-vivo-Effektes haben. Die Unterschiede bei den Ergebnissen aus Ussing-Kammer und Ligated Loop sind wahrscheinlich auf die geringere absorptive Oberfläche in der Ussing-Kammer, die teilweise unphysiologische Absorption in der Ussing-Kammer und die durch die Präparation hervor gerufene stärkere Mukusbildung in der Ussing-Kammer zurückzuführen. Eine Wirksamkeit von Chitosan-HCl als Permeationsenhancer in vivo erscheint, wenn man diese Daten zugrundelegt, unwahrscheinlich.

Neben dem experimentellen Teil wird im allgemeinen Teil dieser Arbeit ein Überblick über die Einflüsse verschiedener Hilfsstoffe auf die Bioverfügbarkeit unterschiedlicher Wirkstoffe

gegeben. Dabei sind Transporter-vermittelte Interaktionen, die erst kürzlich in Reviews zusammengestellt wurden, ausgespart worden. Zusammen mit den Ergebnissen des experimentellen Teils soll dieser Überblick die Risiken aufzeigen, die durch den Austausch von Hilfsstoffen in Arzneimittelformulierungen entstehen können. Dies ist insbesondere bei der Zulassung von Biowaivern für Substanzen der BCS Klasse III von großer Bedeutung. Ebenfalls sollen Möglichkeiten aufgezeigt werden, die Permeabilität von Substanzen der BCS Klassen III und IV durch Veränderungen an der Formulierung gezielt zu beeinflussen.

7. Literatur

- [1] A. Abdoh, M.M. Al-Omari, A.A. Badwan, A.M. Jaber, Amlodipine besylate-exipients interaction in solid dosage form, *Pharmaceutical development and technology*, 9 (2004) 15-24.
- [2] R. Challa, A. Ahuja, J. Ali, R. Khar, Cyclodextrins in drug delivery: an updated review, *Aaps Pharmscitech*, 6 (2005) 329-357.
- [3] H. Shihora, S. Panda, Superdisintegrants, Utility in Dosage Forms: A Quick Review, *Journal of PHarmaceutical Science and Bioscientific Research*, 1 (2011) 148-153.
- [4] L.X. Yu, G.L. Amidon, J.E. Polli, H. Zhao, M.U. Mehta, D.P. Conner, V.P. Shah, L.J. Lesko, M.-L. Chen, V.H. Lee, Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions, *Pharmaceutical research*, 19 (2002) 921-925.
- [5] T. Lindmark, T. Nikkilä, P. Artursson, Mechanisms of absorption enhancement by medium chain fatty acids in intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275 (1995) 958-964.
- [6] S. Sajeesh, C.P. Sharma, Novel polyelectrolyte complexes based on poly (methacrylic acid)-bis (2-aminopropyl) poly (ethylene glycol) for oral protein delivery, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18 (2007) 1125-1139.
- [7] D.A. Adkin, S.S. Davis, R.A. Sparrow, P.D. Huckle, A.J. Phillips, I.R. Wilding, The effect of different concentrations of mannitol in solution on small intestinal transit: implications for drug absorption, *Pharmaceutical research*, 12 (1995) 393-396.
- [8] G. Cornaire, J. Woodley, P. Hermann, A. Cloarec, C. Arellano, G. Houin, Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates in vitro and in vivo, *International journal of pharmaceutics*, 278 (2004) 119-131.
- [9] J.T. Doluisio, A.N. Martin, Metal complexation of the tetracycline hydrochlorides, *Journal of medicinal chemistry*, 6 (1963) 16-20.
- [10] J.A.G. Morais, M.d.R. Lobato, The new European Medicines Agency guideline on the investigation of bioequivalence, *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 106 (2010) 221-225.
- [11] O. Doroshenko, A. Jetter, K.P. Odenthal, U. Fuhr, Clinical pharmacokinetics of trospium chloride, *Clinical pharmacokinetics*, 44 (2005) 701-720.
- [12] A. Radwan, G.L. Amidon, P. Langguth, Mechanistic investigation of food effect on disintegration and dissolution of BCS class III compound solid formulations: the importance of viscosity, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, (2012).
- [13] I.-S. Song, S.-J. Chung, C.-K. Shim, Contribution of ion pair complexation with bile salts to biliary excretion of organic cations in rats, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281 (2001) G515-G525.
- [14] D. Patel, K.K. Sawant, Oral bioavailability enhancement of acyclovir by self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS), *Drug development and industrial pharmacy*, 33 (2007) 1318-1326.
- [15] J. Arnal, I. Gonzalez-Alvarez, M. Bermejo, G. Amidon, H. Junginger, S. Kopp, K. Midha, V. Shah, S. Stavchansky, J. Dressman, Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Aciclovir, *Journal of pharmaceutical sciences*, 97 (2008) 5061-5073.
- [16] D.B. Smith, W. Cook, J. Neal, Physical studies on carrageenin and carrageenin fractions, *Archives of biochemistry and biophysics*, 53 (1954) 192-204.
- [17] C. Benard, A. Cultrone, C. Michel, C. Rosales, J.-P. Segain, M. Lahaye, J.-P. Galmiche, C. Cherbut, H.M. Blottière, Degraded carrageenan causing colitis in rats induces TNF secretion and ICAM-1 upregulation in monocytes through NF- κ B activation, *PLoS one*, 5 (2010) e8666.

- [18] M. Kanneganti, M. Mino-Kenudson, E. Mizoguchi, Animal models of colitis-associated carcinogenesis, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011 (2011).
- [19] J.F.W.E.C.o.F.A. Meeting, Evaluation of certain food additives and contaminants: fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, World Health Organization, 2002.
- [20] K.-H. Song, N.D. Eddington, The influence of stabilizer and bioadhesive polymer on the permeation-enhancing effect of AT1002 in the nasal delivery of a paracellular marker, *Archives of pharmacal research*, 35 (2012) 359-366.
- [21] F. Acartürk, *Mucoadhesive vaginal drug delivery systems, variations*, 1 (2009) 6.
- [22] M.C. Bonferoni, P. Chetoni, P. Giunchedi, S. Rossi, F. Ferrari, S. Burgalassi, C. Caramella, Carrageenan–gelatin mucoadhesive systems for ion-exchange based ophthalmic delivery: in vitro and preliminary in vivo studies, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 57 (2004) 465-472.
- [23] S. Grube, U. Wolfrum, P. Langguth, Characterization of the Epithelial Permeation Enhancing Effect of Basic Butylated Methacrylate Copolymer • In Vitro Studies, *Biomacromolecules*, 9 (2008) 1398-1405.
- [24] A.F. Hofmann, *Enterohepatic circulation of bile acids*, Wiley Online Library, 1969.
- [25] J.B. Dressman, G.L. Amidon, C. Reppas, V.P. Shah, Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms, *Pharmaceutical research*, 15 (1998) 11-22.
- [26] K. Tsutsumi, S.K. Li, R.V. Hymas, C.L. Teng, L.G. Tillman, G.E. Hardee, W.I. Higuchi, N.F. Ho, Systematic studies on the paracellular permeation of model permeants and oligonucleotides in the rat small intestine with chenodeoxycholate as enhancer, *Journal of pharmaceutical sciences*, 97 (2008) 350-367.
- [27] P. Langguth, G. Fricker, H. Wunderli-Allenspach, *Biopharmazie*, Wiley-VCH, 2012.
- [28] G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart,, Germany, 1999.
- [29] K.H. Bauer, K.-H. Frömmering, C. Führer, *Lehrbuch der Pharmazeutische Technologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1999.
- [30] A.L. Ungell, S. Nylander, S. Bergstrand, A. Sjöberg, H. Lennernas, Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat, *J Pharm Sci*, 87 (1998) 360-366.
- [31] J.L. Madara, Regulation of the movement of solutes across tight junctions, *Annual review of physiology*, 60 (1998) 143-159.
- [32] A. Nusrat, J. Turner, J. Madara, IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279 (2000) G851-G857.
- [33] B.R. Stevenson, B.H. Keon, The tight junction: morphology to molecules, *Annual review of cell and developmental biology*, 14 (1998) 89-109.
- [34] A. Dunina-Barkovskaya, Tight junctions: facts and models, *Membrane & cell biology*, 11 (1998) 555.
- [35] B. Ernst, A. Vögtli, *Moderne Pharmakokinetik: Transport durch Membranen*, VCH, 2010.
- [36] W. Rubas, M. Cromwell, Z. Shahrokh, J. Villagran, T.N. Nguyen, M. Wellton, T.H. Nguyen, R. Mersny, Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue, *Journal of pharmaceutical sciences*, 85 (1996) 165-169.
- [37] D.A. Adkin, S.S. Davis, R.A. Sparrow, P.D. Huckle, A.J. Phillips, I.R. Wilding, The effects of pharmaceutical excipients on small intestinal transit, *British journal of clinical pharmacology*, 39 (1995) 381-387.
- [38] K.M. Koch, A.F. Parr, J.J. Tomlinson, E.P. Sandefer, G.A. Digenis, K.H. Donn, J.R. Powell, Effect of sodium acid pyrophosphate on ranitidine bioavailability and gastrointestinal transit time, *Pharm Res*, 10 (1993) 1027-1030.

-
- [39] E.K. Salminen, S.J. Salminen, L. Porkka, P. Kwasowski, V. Marks, P.E. Koivistoinen, Xylitol vs glucose: effect on the rate of gastric emptying and motilin, insulin, and gastric inhibitory polypeptide release, *The American journal of clinical nutrition*, 49 (1989) 1228-1232.
- [40] D.A. Adkin, S.S. Davis, R.A. Sparrow, P.D. Huckle, I.R. Wilding, The effect of mannitol on the oral bioavailability of cimetidine, *J Pharm Sci*, 84 (1995) 1405-1409.
- [41] D.H. Staniforth, Comparison of oro-caecal transit times assessed by the lactulose/breath hydrogen and the sulphasalazine/sulphapyridine methods, *Gut*, 30 (1989) 978-982.
- [42] M.L. Chen, A.B. Straughn, N. Sadrieh, M. Meyer, P.J. Faustino, A.B. Ciavarella, B. Meibohm, C.R. Yates, A.S. Hussain, A modern view of excipient effects on bioequivalence: case study of sorbitol, *Pharm Res*, 24 (2007) 73-80.
- [43] M. Badiga, N. Jain, C. Casanova, C. Pitchumoni, Diarrhea in diabetics: the role of sorbitol, *Journal of the American College of Nutrition*, 9 (1990) 578-582.
- [44] A. Fassihi, R. Dowse, S. Robertson, Influence of sorbitol solution on the bioavailability of theophylline, *International journal of pharmaceutics*, 72 (1991) 175-178.
- [45] C.L. Dobson, S.S. Davis, S. Chauhan, R.A. Sparrow, I.R. Wilding, The effect of oleic acid on the human ileal brake and its implications for small intestinal transit of tablet formulations, *Pharm Res*, 16 (1999) 92-96.
- [46] A.W. Basit, F. Podczeczek, J.M. Newton, W.A. Waddington, P.J. Ell, L.F. Lacey, Influence of polyethylene glycol 400 on the gastrointestinal absorption of ranitidine, *Pharm Res*, 19 (2002) 1368-1374.
- [47] A.W. Basit, J.M. Newton, M.D. Short, W.A. Waddington, P.J. Ell, L.F. Lacey, The effect of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit: implications for the formulation of poorly-water soluble drugs, *Pharmaceutical research*, 18 (2001) 1146-1150.
- [48] M. Tomita, M. Hayashi, S. Awazu, Comparison of absorption-enhancing effect between sodium caprate and disodium ethylenediaminetetraacetate in Caco-2 cells, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 17 (1994) 753-755.
- [49] E. Windsor, G. Cronheim, Gastro-intestinal absorption of heparin and synthetic heparinoids, *Nature*, 190 (1961) 263-264.
- [50] H. Kunze, G. Rehbock, W. Vogt, Absorption of salicylic acid and its isomers from the rat jejunum, *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 273 (1972) 331-340.
- [51] T. Ishizawa, M. Hayashi, S. Awazu, Enhancement of jejunal and colonic absorption of fosfomycin by promoters in the rat, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 39 (1987) 892-895.
- [52] I.B. Kibangou, F. Bureau, S. Allouche, P. Arhan, D. Bougle, Interactions between ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and iron absorption pathways, in the Caco-2 model, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 46 (2008) 3414-3416.
- [53] J. Raiman, S. Tormalehto, K. Yritys, H.E. Junginger, J. Monkkonen, Effects of various absorption enhancers on transport of clodronate through Caco-2 cells, *Int J Pharm*, 261 (2003) 129-136.
- [54] H. Shinichiro, Y. Takatsuka, M. Hiroyuki, Effect of surfactants on the nasal absorption of insulin in rats, *International Journal of Pharmaceutics*, 9 (1981) 165-172.
- [55] I.A. Siegel, H.P. Gordon, Effects of surfactants on the permeability of canine oral mucosa in vitro, *Toxicology letters*, 26 (1985) 153-158.
- [56] N. Khalafallah, M.W. Gouda, S.A. Khalil, Effect of surfactants on absorption through membranes IV: Effects of dioctyl sodium sulfosuccinate on absorption of a poorly absorbable drug, phenolsulfonphthalein, in humans, *Journal of pharmaceutical sciences*, 64 (1975) 991-994.
- [57] W. Chen, Y.-Q. Miao, D.-J. Fan, S.-S. Yang, X. Lin, L.-K. Meng, X. Tang, Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats, *Aaps Pharmscitech*, 12 (2011) 705-711.
-

-
- [58] E.J. van Hoogdalem, M.A. Hardens, A.G. de Boer, D.D. Breimer, Absorption enhancement of rectally infused cefoxitin sodium by medium-chain fatty acids in conscious rats: concentration-effect relationship, *Pharm Res*, 5 (1988) 453-456.
- [59] S. Mori, A. Matsuura, Y.V. Rama Prasad, K. Takada, Studies on the intestinal absorption of low molecular weight heparin using saturated fatty acids and their derivatives as an absorption enhancer in rats, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27 (2004) 418-421.
- [60] T. Sawada, T. Ogawa, M. Tomita, M. Hayashi, S. Awazu, Role of paracellular pathway in nonelectrolyte permeation across rat colon epithelium enhanced by sodium caprate and sodium caprylate, *Pharmaceutical research*, 8 (1991) 1365-1371.
- [61] T. Lindmark, T. Nikkila, P. Artursson, Mechanisms of absorption enhancement by medium chain fatty acids in intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 275 (1995) 958-964.
- [62] A.C. Chao, J.V. Nguyen, M. Broughall, A. Griffin, J.A. Fix, P.E. Daddona, In vitro and in vivo evaluation of effects of sodium caprate on enteral peptide absorption and on mucosal morphology, *Int J Pharm*, 191 (1999) 15-24.
- [63] A.A. Raouf, Z. Ramtoola, B. McKenna, R.Z. Yu, G. Hardee, R.S. Geary, Effect of sodium caprate on the intestinal absorption of two modified antisense oligonucleotides in pigs, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 17 (2002) 131-138.
- [64] S.M. Krug, M. Amasheh, I. Dittmann, I. Christoffel, M. Fromm, S. Amasheh, Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells, *Biomaterials*, 34 (2013) 275-282.
- [65] M. Tomita, T. Sawada, T. Ogawa, H. Ouchi, M. Hayashi, S. Awazu, Differences in the enhancing effects of sodium caprate on colonic and jejunal drug absorption, *Pharm Res*, 9 (1992) 648-653.
- [66] T. Lindmark, J.D. Soderholm, G. Olaison, G. Alvan, G. Ocklind, P. Artursson, Mechanism of absorption enhancement in humans after rectal administration of ampicillin in suppositories containing sodium caprate, *Pharm Res*, 14 (1997) 930-935.
- [67] L.G. Tillman, R.S. Geary, G.E. Hardee, Oral delivery of antisense oligonucleotides in man, *Journal of pharmaceutical sciences*, 97 (2007) 225-236.
- [68] J.K. Amory, T.W. Leonard, S.T. Page, E. O'Toole, M.J. McKenna, W.J. Bremner, Oral administration of the GnRH antagonist acyline, in a GIPET-enhanced tablet form, acutely suppresses serum testosterone in normal men: single-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 64 (2009) 641-645.
- [69] L. Lohikangas, M. Wilen, M. Einarsson, P. Artursson, Effects of a new lipid-based drug delivery system on the absorption of low molecular weight heparin (Fragmin) through monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells and after rectal administration to rabbits, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1 (1994) 297-305.
- [70] P.-Y. Yeh, P.L. Smith, H. Ellens, Effect of medium-chain glycerides on physiological properties of rabbit intestinal epithelium in vitro, *Pharmaceutical research*, 11 (1994) 1148-1154.
- [71] E. Duizer, C. van der Wulp, C.H. Versantvoort, J.P. Groten, Absorption enhancement, structural changes in tight junctions and cytotoxicity caused by palmitoyl carnitine in Caco-2 and IEC-18 cells, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 287 (1998) 395-402.
- [72] S.C. Sutton, E.L. LeCluyse, K. Engle, J.D. Pipkin, J.A. Fix, Enhanced bioavailability of cefoxitin using palmitoylcarnitine. II. Use of directly compressed tablet formulations in the rat and dog, *Pharmaceutical research*, 10 (1993) 1516-1520.
- [73] S. Kagatani, T. Shinoda, M. Fukui, T. Ohmura, S. Hasumi, T. Sonobe, Enhancement of nasal salmon calcitonin absorption by lauroylcarnitine chloride in rats, *Pharm Res*, 13 (1996) 739-743.
-

- [74] D.L. Burcham, B.A. Aungst, M. Hussain, M.A. Gorko, C.Y. Quon, S.-M. Huang, The effect of absorption enhancers on the oral absorption of the GP IIB/IIIa receptor antagonist, DMP 728, in rats and dogs, *Pharmaceutical research*, 12 (1995) 2065-2070.
- [75] Y.H. Lin, F.L. Mi, C.T. Chen, W.C. Chang, S.F. Peng, H.F. Liang, H.W. Sung, Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 146-152.
- [76] F. Maestrelli, M. Cirri, N. Mennini, N. Zerrouk, P. Mura, Improvement of oxaprozin solubility and permeability by the combined use of cyclodextrin, chitosan, and bile components, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 78 (2011) 385-393.
- [77] L. Illum, N.F. Farraj, S.S. Davis, Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs, *Pharmaceutical research*, 11 (1994) 1186-1189.
- [78] T. Aspdén, L. Illum, Ø. Skaugrud, Chitosan as a nasal delivery system: evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity using rat models, *European journal of pharmaceutical sciences*, 4 (1996) 23-31.
- [79] P. Artursson, T. Lindmark, S.S. Davis, L. Illum, Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2), *Pharmaceutical research*, 11 (1994) 1358-1361.
- [80] H.L. Luessen, B.J. de Leeuw, M.W. Langemeyer, A.B. de Boer, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug buserelin in vivo, *Pharm Res*, 13 (1996) 1668-1672.
- [81] A.F. Kotze, H.L. Luessen, A.G. de Boer, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Chitosan for enhanced intestinal permeability: prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 7 (1999) 145-151.
- [82] M. Thanou, S. Henderson, A. Kydonieus, C. Elson, N-sulfonato-N,O-carboxymethylchitosan: a novel polymeric absorption enhancer for the oral delivery of macromolecules, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 117 (2007) 171-178.
- [83] M. Thanou, M.T. Nihot, M. Jansen, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo, *J Pharm Sci*, 90 (2001) 38-46.
- [84] M. Thanou, J.C. Verhoef, P. Marbach, H.E. Junginger, Intestinal absorption of octreotide: N-trimethyl chitosan chloride (TMC) ameliorates the permeability and absorption properties of the somatostatin analogue in vitro and in vivo, *J Pharm Sci*, 89 (2000) 951-957.
- [85] A. Kotzé, B. De Leeuw, H. Lueßen, A. De Boer, J. Verhoef, H. Junginger, Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: in vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers, *International journal of pharmaceuticals*, 159 (1997) 243-253.
- [86] A.F. Kotzé, H.L. Lueßen, B.J. de Leeuw, A. De Boer, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2), *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 51 (1998) 35.
- [87] G. Sandri, M.C. Bonferoni, S. Rossi, F. Ferrari, C. Boselli, C. Caramella, Insulin-loaded nanoparticles based on N-trimethyl chitosan: in vitro (Caco-2 model) and ex vivo (excised rat jejunum, duodenum, and ileum) evaluation of penetration enhancement properties, *AAPS PharmSciTech*, 11 (2010) 362-371.
- [88] A.F. Kotze, H.L. Luessen, B.J. de Leeuw, B.G. de Boer, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, N-trimethyl chitosan chloride as a potential absorption enhancer across mucosal surfaces: in vitro evaluation in intestinal epithelial cells (Caco-2), *Pharm Res*, 14 (1997) 1197-1202.

-
- [89] M. Thanou, B. Florea, M. Langemeyer, J. Verhoef, H. Junginger, N-trimethylated chitosan chloride (TMC) improves the intestinal permeation of the peptide drug busserelin in vitro (Caco-2 cells) and in vivo (rats), *Pharmaceutical research*, 17 (2000) 27-31.
- [90] A. Bernkop-Schnürch, U. Brandt, A. Clausen, Synthesis and in vitro evaluation of chitosan-cysteine conjugates, *Sci. Pharm*, 67 (1999) 196-208.
- [91] L. Yin, J. Ding, C. He, L. Cui, C. Tang, C. Yin, Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery, *Biomaterials*, 30 (2009) 5691-5700.
- [92] L. Na, J. Wang, L. Wang, S. Mao, A novel permeation enhancer: N-succinyl chitosan on the intranasal absorption of isosorbide dinitrate in rats, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2012).
- [93] V. Sancho-Chust, M. Bengochea, S. Fabra-Campos, V.G. Casabo, M.J. Martinez-Camara, A. Martin-Villodre, Experimental studies on the influence of surfactants on intestinal absorption of drugs. Cefadroxil as model drug and sodium lauryl sulfate as model surfactant: studies in rat duodenum, *Arzneimittel-Forschung*, 45 (1995) 1013-1017.
- [94] T. Yang, J.J. Arnold, F. Ahsan, Tetradecylmaltoside (TDM) enhances in vitro and in vivo intestinal absorption of enoxaparin, a low molecular weight heparin, *Journal of drug targeting*, 13 (2005) 29-38.
- [95] P.P. Tirumalasetty, J.G. Eley, Permeability enhancing effects of the alkylglycoside, octylglucoside, on insulin permeation across epithelial membrane in vitro, *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 9 (2006) 32-39.
- [96] K. Tsutsumi, S.K. Li, R.V. Hymas, C.L. Teng, L.G. Tillman, G.E. Hardee, W.I. Higuchi, N.F. Ho, Systematic studies on the paracellular permeation of model permeants and oligonucleotides in the rat small intestine with chenodeoxycholate as enhancer, *Journal of pharmaceutical sciences*, 97 (2008) 350-367.
- [97] U. Fagundes-Neto, S. Teichberg, M. Bayne, B. Morton, F. Lifshitz, Bile salt-enhanced rat jejunal absorption of a macromolecular tracer, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 44 (1981) 18.
- [98] E. Ziv, M. Kidron, E.M. Berry, H. Bar-On, Bile salts promote the absorption of insulin from the rat colon, *Life sciences*, 29 (1981) 803-809.
- [99] P. Sharma, M.V. Varma, H.P. Chawla, R. Panchagnula, Absorption enhancement, mechanistic and toxicity studies of medium chain fatty acids, cyclodextrins and bile salts as peroral absorption enhancers, *Il Farmaco*, 60 (2005) 884-893.
- [100] Z. Degim, N. Unal, D. Essiz, U. Abbasoglu, The effect of various liposome formulations on insulin penetration across Caco-2 cell monolayer, *Life Sci*, 75 (2004) 2819-2827.
- [101] K. Taniguchi, S. Muranishi, H. Sezaki, Enhanced intestinal permeability to macromolecules II. Improvement of the large intestinal absorption of heparin by lipid-surfactant mixed micelles in rat, *International Journal of Pharmaceutics*, 4 (1980) 219-228.
- [102] S. Feldman, M. Gibaldi, Physiologic surface-active agents and drug absorption I: Effect of Sodium Taurodeoxycholate on salicylate transfer across the everted rat intestine, *Journal of pharmaceutical sciences*, 58 (1969) 425-428.
- [103] K. ICHIKAWA, I.O. ATA, M. MITOMI, S. KAWAMURA, H. MAENO, H. KAWATA, Rectal absorption of insulin suppositories in rabbits, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 32 (1980) 314-318.
- [104] K. Walters, P. Dugard, A. Florence, Non-ionic surfactants and gastric mucosal transport of paraquat, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 33 (1981) 207-213.
- [105] Y. Shen, Y. Lu, M. Jv, J. Hu, Q. Li, J. Tu, Enhancing effect of Labrasol on the intestinal absorption of ganciclovir in rats, *Drug development and industrial pharmacy*, 37 (2011) 1415-1421.
-

- [106] G. Perera, J. Barthelmes, A. Vetter, C. Krieg, C. Uhlschmied, G.K. Bonn, A. Bernkop-Schnurch, Thiolated polycarbophil/glutathione: defining its potential as a permeation enhancer for oral drug administration in comparison to sodium caprate, *Drug delivery*, 18 (2011) 415-423.
- [107] S. Grube, U. Wolfrum, P. Langguth, Characterization of the epithelial permeation enhancing effect of basic butylated methacrylate copolymer--in vitro studies, *Biomacromolecules*, 9 (2008) 1398-1405.
- [108] J. Hastewella, S. Lynch, R. Fox, I. Williamson, P. Skelton-Stroud, M. Mackay, Enhancement of human calcitonin absorption across the rat colon in vivo, *International journal of pharmaceutics*, 101 (1994) 115-120.
- [109] C.S. Karyekar, A. Fasano, S. Raje, R. Lu, T.C. Dowling, N.D. Eddington, Zonula occludens toxin increases the permeability of molecular weight markers and chemotherapeutic agents across the bovine brain microvessel endothelial cells, *J Pharm Sci*, 92 (2003) 414-423.
- [110] K.H. Song, N.D. Eddington, The influence of AT1002 on the nasal absorption of molecular weight markers and therapeutic agents when co-administered with bioadhesive polymers and an AT1002 antagonist, AT1001, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 64 (2012) 30-39.
- [111] A. Hannula, M. Marvola, M. Rajamaeki, S. Ojantakanen, Effects of pH regulators used as additives on the bioavailability of ibuprofen from hard gelatin capsules, *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, (1991) 221.
- [112] M. Marvola, S. Nykänen, M. Nokelainen, Bioavailability of erythromycin acistrate from hard gelatin capsules containing sodium bicarbonate, *Pharmaceutical research*, 8 (1991) 1056-1058.
- [113] L.Z. Benet, V. Bhatia, P. Singh, J.K. Guillory, T.D. Sokoloski, Effect of inert tablet ingredients on drug absorption I. Effect of polyethylene glycol 4000 on the intestinal absorption of four barbiturates, *Journal of pharmaceutical sciences*, 55 (1966) 63-68.
- [114] F. Bochner, W. Hooper, J. Tyrer, M. Eadie, Factors involved in an outbreak of phenytoin intoxication, *Journal of the neurological sciences*, 16 (1972) 481-487.
- [115] A.T. Cacek, Review of alterations in oral phenytoin bioavailability associated with formulation, antacids, and food, *Therapeutic drug monitoring*, 8 (1986) 166-171.
- [116] M. Nakano, Effects of interaction with surfactants, adsorbents, and other substances on the permeation of chlorpromazine through a dimethyl polysiloxane membrane, *J Pharm Sci*, 60 (1971) 571-575.
- [117] T.F. Chin, J.L. Lach, Drug diffusion and bioavailability: tetracycline metallic chelation, *American journal of hospital pharmacy*, 32 (1975) 625-629.
- [118] A.F. Zak, O.B. Ermolova, T.A. Batuashvili, G.S. Minasova, L. Nesterova, [Bioavailability of tetracycline hydrochloride capsules (an in vivo study)], *Antibiotiki*, 23 (1978) 441-445.
- [119] F. Monajjemzadeh, D. Hassanzadeh, H. Valizadeh, M.R. Siah-Shadbad, J.S. Mojarrad, T.A. Robertson, M.S. Roberts, Compatibility studies of acyclovir and lactose in physical mixtures and commercial tablets, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 73 (2009) 404-413.
- [120] A.F.O. Santos, I. Basilio, F. De Souza, A.F. Medeiros, M.F. Pinto, D. De Santana, R. Macedo, Application of thermal analysis in study of binary mixtures with metformin, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 93 (2008) 361-364.
- [121] S. Botha, A. Lötter, Compatibility study between oxprenolol hydrochloride and tablet excipients using differential scanning calorimetry, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 15 (1989) 1843-1853.
- [122] R. Voigt, G. Pergande, S. Keipert, [Comparative studies on the study of drug-excipient interactions with vapor pressure osmometry and equilibrium dialysis], *Die Pharmazie*, 39 (1984) 760-763.

- [123] M.S. Cunha-Filho, R. Martinez-Pacheco, M. Landin, Compatibility of the antitumoral beta-lapachone with different solid dosage forms excipients, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 45 (2007) 590-598.
- [124] N. Fransen, M. Morin, E. Bjork, K. Edsman, Physicochemical interactions between drugs and superdisintegrants, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 60 (2008) 1583-1589.
- [125] V. Grabovac, T. Schmitz, F. Föger, A. Bernkop-Schnürch, Papain: an effective permeation enhancer for orally administered low molecular weight heparin, *Pharmaceutical research*, 24 (2007) 1001-1006.
- [126] A. Leone-Bay, D.R. Paton, J. Freeman, C. Lercara, D. O'Toole, D. Gschneidner, E. Wang, E. Harris, C. Rosado, T. Rivera, Synthesis and evaluation of compounds that facilitate the gastrointestinal absorption of heparin, *Journal of medicinal chemistry*, 41 (1998) 1163-1171.
- [127] R.A. Baughman, S.C. Kapoor, R.K. Agarwal, J. Kisicki, F. Catella-Lawson, G.A. FitzGerald, Oral delivery of anticoagulant doses of heparin: a randomized, double-blind, controlled study in humans, *Circulation*, 98 (1998) 1610-1615.
- [128] S. Berkowitz, V. Marder, G. Kosutic, R. Baughman, Oral heparin administration with a novel drug delivery agent (SNAC) in healthy volunteers and patients undergoing elective total hip arthroplasty, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1 (2003) 1914-1919.
- [129] K.M. Koch, A.F. Parr, J.J. Tomlinson, E.P. Sandefer, G.A. Digenis, K.H. Donn, J.R. Powell, Effect of sodium acid pyrophosphate on ranitidine bioavailability and gastrointestinal transit time, *Pharmaceutical research*, 10 (1993) 1027-1030.
- [130] A.N. Wick, M.C. Almen, L. Joseph, The metabolism of sorbitol, *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 40 (1951) 542-544.
- [131] J.D. Gryboski, Diarrhea from dietetic candies, *The New England journal of medicine*, 275 (1966) 718.
- [132] D. Kazierad, K. Schlanz, M. Böttorff, Beta blockers, *Principles of therapeutic drug monitoring*, 3rd ed. Vancouver, WA: Applied Therapeutics Inc, (1992) 24-15.
- [133] R. Spiller, I. Trotman, B. Higgins, M. Ghatei, G. Grimble, Y. Lee, S. Bloom, J. Misiewicz, D. Silk, The ileal brake--inhibition of jejunal motility after ileal fat perfusion in man, *Gut*, 25 (1984) 365-374.
- [134] N. Read, C. Miles, D. Fisher, A. Holgate, N. Kime, M. Mitchell, A. Reeve, T. Roche, M. Walker, Transit of a meal through the stomach, small intestine, and colon in normal subjects and its role in the pathogenesis of diarrhea, *Gastroenterology*, 79 (1980) 1276.
- [135] B.J. Aungst, Intestinal permeation enhancers, *Journal of pharmaceutical sciences*, 89 (2000) 429-442.
- [136] J.K. Amory, T.W. Leonard, S.T. Page, E. O'Toole, M.J. McKenna, W.J. Bremner, Oral administration of the GnRH antagonist acyline, in a GIPET[®]-enhanced tablet form, acutely suppresses serum testosterone in normal men: single-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 64 (2009) 641-645.
- [137] T.W. Leonard, J. Lynch, M.J. McKenna, D.J. Brayden, Promoting absorption of drugs in humans using medium-chain fatty acid-based solid dosage forms: GIPET[™], (2006).
- [138] M. Tomita, M. Hayashi, S. Awazu, Absorption-enhancing mechanism of EDTA, caprate, and decanoylcarnitine in Caco-2 cells, *Journal of pharmaceutical sciences*, 85 (1996) 608-611.
- [139] M. Tomita, M. Hayashi, T. Horie, T. Ishizawa, S. Awazu, Enhancement of colonic drug absorption by the transcellular permeation route, *Pharmaceutical research*, 5 (1988) 786-789.
- [140] H. Kajii, T. Horie, M. Hayashi, S. Awazu, Fluorescence study of the membrane-perturbing action of sodium caprylate as related to promotion of drug absorption, *Journal of pharmaceutical sciences*, 77 (1988) 390-392.
- [141] S. Hirano, Y. Noishiki, The blood compatibility of chitosan and N-acylchitosans, *Journal of biomedical materials research*, 19 (2004) 413-417.

- [142] T. Chandy, C.P. Sharma, Chitosan-as a biomaterial, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 18 (1990) 1-24.
- [143] C.-M. Lehr, J.A. Bouwstra, E.H. Schacht, H.E. Junginger, In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers, *International journal of Pharmaceutics*, 78 (1992) 43-48.
- [144] T.J. Aspden, J.D. Mason, N.S. Jones, J. Lowe, Ø. Skaugrud, L. Illum, Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on in vitro and in vivo mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers, *Journal of pharmaceutical sciences*, 86 (1997) 509-513.
- [145] N.G. Schipper, K.M. Vårum, P. Artursson, Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Pharmaceutical research*, 13 (1996) 1686-1692.
- [146] N.G. Schipper, K.M. Vårum, P. Stenberg, G. Ocklind, H. Lennernäs, P. Artursson, Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs: 3: Influence of mucus on absorption enhancement, *European journal of pharmaceutical sciences*, 8 (1999) 335-343.
- [147] P. He, S.S. Davis, L. Illum, In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 166 (1998) 75-88.
- [148] N.G. Schipper, S. Olsson, J.A. Hoogstraate, K.M. Vårum, P. Artursson, Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement, *Pharmaceutical research*, 14 (1997) 923-929.
- [149] G. Ranaldi, I. Marigliano, I. Vespignani, G. Perozzi, Y. Sambuy, The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line, *The Journal of nutritional biochemistry*, 13 (2002) 157-167.
- [150] J. Smith, E. Wood, M. Dornish, Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions, *Pharmaceutical research*, 21 (2004) 43-49.
- [151] F.A. Dorkoosh, C.A. Broekhuizen, G. Borchard, M. Rafiee-Tehrani, J. Verhoef, H.E. Junginger, Transport of octreotide and evaluation of mechanism of opening the paracellular tight junctions using superporous hydrogel polymers in Caco-2 cell monolayers, *Journal of pharmaceutical sciences*, 93 (2004) 743-752.
- [152] J.M. Smith, M. Dornish, E.J. Wood, Involvement of protein kinase C in chitosan glutamate-mediated tight junction disruption, *Biomaterials*, 26 (2005) 3269-3276.
- [153] R. Rosenthal, D. Günzel, C. Finger, S.M. Krug, J.F. Richter, J.-D. Schulzke, M. Fromm, S. Amasheh, The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier, *Biomaterials*, 33 (2012) 2791.
- [154] G. Borchard, H.L. Lueßen, A.G. de Boer, J. Verhoef, C.-M. Lehr, H.E. Junginger, The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption. III: Effects of chitosan-glutamate and carbomer on epithelial tight junctions in vitro, *Journal of Controlled Release*, 39 (1996) 131-138.
- [155] A. Jintapattanakit, S. Mao, T. Kissel, V.B. Junyaprasert, Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70 (2008) 563-571.
- [156] M. Thanou, J. Verhoef, P. Marbach, H. Junginger, Intestinal absorption of octreotide: N-trimethyl chitosan chloride (TMC) ameliorates the permeability and absorption properties of the somatostatin analogue in vitro and in vivo, *Journal of pharmaceutical sciences*, 89 (2000) 951-957.
- [157] M.M. Thanou, A.F. Kotze, T. Scharringhausen, H.L. Luessen, A.G. de Boer, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Effect of degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal caco-2 cell monolayers, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 64 (2000) 15-25.

- [158] A. Kotze, M. Thanou, J. Verhoef, H. Junginger, Chitosan and N-trimethyl chitosan chloride as absorption enhancers for nasal and rectal delivery of insulin, in: *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater*, 1998, pp. 479.
- [159] M. Thanou, S. Henderson, A. Kydonieus, C. Elson, N-sulfonato-N, O-carboxymethylchitosan: a novel polymeric absorption enhancer for the oral delivery of macromolecules, *Journal of controlled release*, 117 (2007) 171-178.
- [160] M. Tomita, M. Shiga, M. Hayashi, S. Awazu, Enhancement of colonic drug absorption by the paracellular permeation route, *Pharmaceutical research*, 5 (1988) 341-346.
- [161] M. Tomita, M. Hayashi, S. Awazu, Comparison of absorption-enhancing effect between sodium caprate and disodium ethylenediaminetetraacetate in Caco-2 cells, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 17 (1994) 753.
- [162] J. Heimbach, S. Rieth, F. Mohamedshah, R. Slesinski, P. Samuel-Fernando, T. Sheehan, R. Dickmann, J. Borzelleca, Safety assessment of iron EDTA [sodium iron (Fe³⁺) ethylenediaminetetraacetic acid]: summary of toxicological, fortification and exposure data, *Food and chemical toxicology*, 38 (2000) 99-111.
- [163] R.F. Hurrell, M.B. Reddy, J. Burri, J.D. Cook, An evaluation of EDTA compounds for iron fortification of cereal-based foods, *British Journal of Nutrition*, 84 (2000) 903-910.
- [164] I. Kibangou, F. Bureau, S. Allouche, P. Arhan, D. Bouglé, Interactions between ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and iron absorption pathways, in the Caco-2 model, *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2008) 3414-3416.
- [165] J.A. Fix, K. Engle, P.A. Porter, P. Leppert, S. Selk, C. Gardner, J. Alexander, Acylcarnitines: drug absorption-enhancing agents in the gastrointestinal tract, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 251 (1986) G332-G340.
- [166] S.C. Sutton, E.L. LeCluyse, L. Cammack, J.A. Fix, Enhanced bioavailability of cefoxitin using palmitoyl L-carnitine. I. Enhancer activity in different intestinal regions, *Pharmaceutical research*, 9 (1992) 191-194.
- [167] A.C. Chao, M.T. Taylor, P.E. Daddona, M. Broughall, J.A. Fix, Molecular weight-dependent paracellular transport of fluorescent model compounds induced by palmitoylcarnitine chloride across the human intestinal epithelial cell line Caco-2, *Journal of drug targeting*, 6 (1998) 37-43.
- [168] J.H. Hochman, J.A. Fix, E.L. LeCluyse, In vitro and in vivo analysis of the mechanism of absorption enhancement by palmitoylcarnitine, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 269 (1994) 813-822.
- [169] S. Kagatani, T. Shinoda, M. Fukui, T. Ohmura, S. Hasumi, T. Sonobe, Enhancement of nasal salmon calcitonin absorption by lauroylcarnitine chloride in rats, *Pharmaceutical research*, 13 (1996) 739-743.
- [170] A. Hofmann, D. Small, Detergent properties of bile salts: correlation with physiological function, *Annual review of medicine*, 18 (1967) 333-376.
- [171] D.M. Small, The physical chemistry of cholanic acids, *The bile acids*, 1 (1971) 249-356.
- [172] A.F. Hofmann, A. Roda, Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem, *Journal of lipid research*, 25 (1984) 1477-1489.
- [173] M.C. Carey, D. Small, C. Bliss, Lipid digestion and absorption, *Annual Review of Physiology*, 45 (1983) 651-677.
- [174] J. Sjövall, Bile acids in man under normal and pathological conditions bile acids and steroids 73, *Clinica Chimica Acta*, 5 (1960) 33-41.
- [175] V. Chadwick, T. Gaginella, G. Carlson, J. Debongnie, S. Phillips, A. Hofmann, Effect of molecular structure on bile acid-induced alterations in absorptive function, permeability, and morphology in the perfused rabbit colon, *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 94 (1979) 661.

- [176] S. Feldman, M. Gibaldi, Bile salt-induced permeability changes in the isolated rat intestine, in: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY), Royal Society of Medicine, 1969, pp. 1031-1033.
- [177] S. Lamabadusuriya, E. Guiraldes, J. Harries, Influence of mixtures of taurocholate, fatty acids, and monoolein on the toxic effects of deoxycholate in rat jejunum in vivo, *Gastroenterology*, 69 (1975) 463.
- [178] S. Muranishi, Y. Tokunaga, K. Taniguchi, H. Sezaki, Potential absorption of heparin from the small intestine and the large intestine in the presence of monoolein mixed micelles, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 25 (1977) 1159.
- [179] I.K. Chun, K.M. Lee, K.E. Lee, H.S. Gwak, Effects of bile salts on gastrointestinal absorption of pravastatin, *Journal of pharmaceutical sciences*, 101 (2012) 2281-2287.
- [180] G. Gullikson, W. Cline, V. Lorenzsonn, L. Benz, W. Olsen, P. Bass, Effects of anionic surfactants on hamster small intestinal membrane structure and function: relationship to surface activity, *Gastroenterology*, 73 (1977) 501.
- [181] A. Helenius, K. Simons, Solubilization of membranes by detergents, *Biochimica et biophysica acta*, 415 (1975) 29.
- [182] S. Feldman, M. Reinhard, C. Willson, Effect of sodium taurodeoxycholate on biological membranes: release of phosphorus, phospholipid, and protein from everted rat small intestine, *Journal of pharmaceutical sciences*, 62 (1973) 1961-1964.
- [183] S. Feldman, M. Salvino, M. Gibaldi, Physiologic surface-active agents and drug absorption VII: Effect of sodium deoxycholate on phenol red absorption in the rat, *Journal of pharmaceutical sciences*, 59 (1970) 705-707.
- [184] A. Fasano, G. Budillon, S. Guandalini, R. Cuomo, G. Parrilli, A. Cangiotti, M. Morroni, A. Rubino, Bile acids reversible effects on small intestinal permeability, *Digestive diseases and sciences*, 35 (1990) 801-808.
- [185] T.S. Low-Beer, R.E. Schneider, W.O. Dobbins, Morphological changes of the small-intestinal mucosa of guinea pig and hamster following incubation in vitro and perfusion in vivo with unconjugated bile salts, *Gut*, 11 (1970) 486-492.
- [186] A.M. Dawson, K.J. Isselbacher, Studies on lipid metabolism in the small intestine with observations on the role of bile salts, *Journal of Clinical Investigation*, 39 (1960) 730.
- [187] R. Donaldson Jr, Studies on the pathogenesis of steatorrhea in the blind loop syndrome, *Journal of Clinical Investigation*, 44 (1965) 1815.
- [188] L.J. SCHOENFIELD, J.M. LACHIN, R.A. BAUM, R.L. HABIG, R.F. HANSON, T. HERSH, N. Hightower, A.F. HOFMANN, E.C. LASSER, J.W. MARKS, Chenodiol (Chenodeoxycholic Acid) for Dissolution of Gallstones: The National Cooperative Gallstone Study A Controlled Trial of Efficacy and Safety, *Annals of internal medicine*, 95 (1981) 257-282.
- [189] J. Iser, A. Sali, Chenodeoxycholic acid: a review of its pharmacological properties and therapeutic use, *Drugs*, 21 (1981) 90-119.
- [190] S. Guarini, W. Ferrari, Structural restriction in bile acids and non-ionic detergents for promotion of heparin absorption from rat gastro-intestinal tract, *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 271 (1984) 4.
- [191] H. Shinichiro, Y. Takatsuka, M. Hiroyuki, Mechanisms for the enhancement of the nasal absorption of insulin by surfactants, *International Journal of Pharmaceutics*, 9 (1981) 173-184.
- [192] H.F. Smyth Jr, J.C. Calandra, Toxicologic studies of alkylphenol polyoxyethylene surfactants, *Toxicology and applied pharmacology*, 14 (1969) 315-334.

-
- [193] R. Keller, M. Berenson, F. Moody, J. Freston, The effect of detergent treatment of the gastric mucosa on drug transport, in: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY), Royal Society of Medicine, 1976, pp. 730-735.
- [194] K. Kakemi, H. Sezaki, S. Muranishi, Y. Tsujimura, Absorption and excretion of drugs. XL. Enhancement of the rectal absorption of pharmaceutical amines with lauryl sulfate and saccharinate anions, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 17 (1969) 1641.
- [195] T. Nadai, R. Kondo, A. Tatematsu, H. Sezaki, Drug-induced histological changes and its consequences on the permeability of the small intestinal mucosa. I. EDTA, tetracycline, and sodium laurylsulfate, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 20 (1972) 1139.
- [196] R. Engel, S. Riggi, Intestinal absorption of heparin facilitated by sulfated or sulfonated surfactants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58 (1969) 706-710.
- [197] D. Saunders, J. Sillery, D. Rachmilewitz, Effect of dioctyl sodium sulfosuccinate on structure and function of rodent and human intestine, *Gastroenterology*, 69 (1975) 380.
- [198] J. Unowsky, C. Behl, G. Beskid, J. Sattler, J. Halpern, R. Cleeland, Effect of medium chain glycerides on enteral and rectal absorption of β -lactam and aminoglycoside antibiotics, *Chemotherapy*, 34 (2009) 272-276.
- [199] M. Sekine, K. Sasahara, T. Kojima, K. Hasegawa, R. Okada, S. Awazu, Improvement of bioavailability of poorly absorbed drugs. I. Effect of medium chain glyceride base on the rectal absorption of cefmetazole sodium in rats, *Journal of pharmacobio-dynamics*, 7 (1984) 856.
- [200] G. Beskid, J. Unowsky, C. Behl, J. Siebelist, J. Tossounian, C. McGarry, N. Shah, R. Cleeland, Enteral, oral, and rectal absorption of ceftriaxone using glyceride enhancers, *Chemotherapy*, 34 (2009) 77-84.
- [201] M. Sekine, E. Maeda, K. Sasahara, R. Okada, K. Kimura, M. Fukami, S. Awazu, Improvement of bioavailability of poorly absorbed drugs. III. Oral acute toxicity and local irritation of medium chain glyceride, *Journal of pharmacobio-dynamics*, 8 (1985) 633.
- [202] L.B. Lopes, N. Murphy, A. Nornoo, Enhancement of transdermal delivery of progesterone using medium-chain mono and diglycerides as skin penetration enhancers, *Pharmaceutical development and technology*, 14 (2009) 524-529.
- [203] M. Baluom, D.I. Friedman, A. Rubinstein, Absorption enhancement of calcitonin in the rat intestine by carbopol-containing submicron emulsions, *International journal of pharmaceuticals*, 154 (1997) 235-243.
- [204] C. Tas, C.K. Ozkan, A. Savaser, Y. Ozkan, U. Tasdemir, H. Altunay, Nasal absorption of metoclopramide from different Carbopol[®] 981 based formulations: In vitro, ex vivo and in vivo evaluation, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 64 (2006) 246-254.
- [205] T.M. Rivera, A. Leone-Bay, D.R. Paton, H.R. Leipold, R.A. Baughman, Oral delivery of heparin in combination with sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl) amino] caprylate: pharmacological considerations, *Pharmaceutical research*, 14 (1997) 1830-1834.
- [206] D. Brayden, E. Creed, A. O'Connell, H. Leipold, R. Agarwal, A. Leone-Bay, Heparin absorption across the intestine: effects of sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl) amino] caprylate in rat in situ intestinal instillations and in Caco-2 monolayers, *Pharmaceutical research*, 14 (1997) 1772-1779.
- [207] D. Malkov, H.-z. Wang, S. Dinh, I. Gomez-Orellana, Pathway of oral absorption of heparin with sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl) amino] caprylate, *Pharmaceutical research*, 19 (2002) 1180-1184.
- [208] R. Hull, A. Kakkar, V. Marder, G. Pineo, M. Goldberg, G. Raskob, P. Trial, Oral SNAC-heparin vs. enoxaparin for preventing venous thromboembolism following total hip replacement, (2002).
- [209] S. Ojantakanen, A. Hannula, M. Marvola, Bioavailability of ibuprofen from hard gelatin capsules containing sodium bicarbonate, lactose or dicalcium phosphate, *Acta Pharmaceutica Fennica*, 99 (1990) 119-127.
-

- [210] A.M. Hannula, M. Marvola, M. Rajamaeki, S. Ojantakanen, Effects of pH regulators used as additives on the bioavailability of ibuprofen from hard gelatin capsules, *Eur J Drug Metab Pharmacokinet, Spec No 3* (1991) 221-227.
- [211] J. Tyrer, M. Eadie, J. Sutherland, W. Hooper, Outbreak of anticonvulsant intoxication in an Australian city, *British medical journal*, 4 (1970) 271.
- [212] N. Fransén, M. Morin, E. Björk, K. Edsman, Physicochemical interactions between drugs and superdisintegrants, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60 (2008) 1583-1589.
- [213] A.S. Narang, A.P. Yamniuk, L. Zhang, S.N. Comezoglu, D.S. Bindra, S. Varia, M.L. Doyle, S. Badawy, Reversible and pH-dependent weak drug-excipient binding does not affect oral bioavailability of high dose drugs, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64 (2012) 553-565.
- [214] A. Abdoh, M. Al-Omari, A. Badwan, A. Jaber, Amlodipine besylate-excipients interaction in solid dosage form, *Pharmaceutical development and technology*, 9 (2004) 15-24.
- [215] F. Monajjemzadeh, D. Hassanzadeh, H. Valizadeh, M.R. Siahi-Shadbad, J.S. Mojarad, T. Robertson, M.S. Roberts, Assessment of feasibility of Maillard reaction between baclofen and lactose by liquid chromatography and tandem mass spectrometry, application to pre formulation studies, *AAPS PharmSciTech*, 10 (2009) 649-659.
- [216] A.F.O. Santos, I. Basilio, F. De Souza, A.F. Medeiros, M.F. Pinto, D. De Santana, R. Macêdo, Application of thermal analysis in study of binary mixtures with metformin, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 93 (2008) 361-364.
- [217] S. Botha, A. Lötter, Compatibility Study Between Oxprenolol Hydrochloride, Temazepam and Tablet Excipients using Differential Scanning Calorimetry, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 16 (1990) 331-345.
- [218] D.D. Wirth, S.W. Baertschi, R.A. Johnson, S.R. Maple, M.S. Miller, D.K. Hallenbeck, S.M. Gregg, Maillard reaction of lactose and fluoxetine hydrochloride, a secondary amine, *Journal of pharmaceutical sciences*, 87 (1998) 31-39.
- [219] N. Sarisuta, P. Lawanprasert, S. Puttipipatkachorn, K. Srikummoon, The influence of drug-excipient and drug-polymer interactions on butt adhesive strength of ranitidine hydrochloride film-coated tablets, *Drug development and industrial pharmacy*, 32 (2006) 463-471.
- [220] P. Mroso, W. Po, A. Li, W. Irwin, Solid-state stability of aspirin in the presence of excipients: Kinetic interpretation, modeling, and prediction, *Journal of pharmaceutical sciences*, 71 (1982) 1096-1101.
- [221] J.C. Reepmeyer, R.D. Kirchhoefer, Isolation of salicylsalicylic acid, acetylsalicylsalicylic acid, and acetylsalicylic anhydride from aspirin tablets by extraction and high-pressure liquid chromatography, *Journal of pharmaceutical sciences*, 68 (1979) 1167-1169.
- [222] S. Kornblum, M. Zoglio, Pharmaceutical heterogeneous systems I. Hydrolysis of aspirin in combination with tablet lubricants in an aqueous suspension, *Journal of pharmaceutical sciences*, 56 (1967) 1569-1575.
- [223] E. Nelson, D. Eppich, J. Carstensen, Topochemical decomposition patterns of aspirin, *Journal of pharmaceutical sciences*, 63 (1974) 755-757.
- [224] F. Jaminet, G. Louis, Influence de quelques lubrifiants sur la stabilité de l'Aspirine dans les comprimés, *Pharm. Acta. Helv*, 43 (1968) 153-157.
- [225] M. Cotton, D. Wu, E. Vadas, Drug-excipient interaction study of enalapril maleate using thermal analysis and scanning electron microscopy, *International journal of pharmaceuticals*, 40 (1987) 129-142.
- [226] R.K. Verma, S. Garg, Compatibility studies between isosorbide mononitrate and selected excipients used in the development of extended release formulations, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 35 (2004) 449-458.

- [227] R. Voigt, G. Pergande, S. Keipert, Comparative studies on the study of drug-excipient interactions with vapor pressure osmometry and equilibrium dialysis], *Die Pharmazie*, 39 (1984) 760.
- [228] A. Marini, V. Berbenni, M. Pegoretti, G. Bruni, P. Cofrancesco, C. Sinistri, M. Villa, Drug-excipient compatibility studies by physico-chemical techniques; The case of Atenolol, *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 73 (2003) 547-561.
- [229] G. Bruni, V. Berbenni, C. Milanese, A. Girella, A. Marini, Drug-excipient compatibility studies in binary and ternary mixtures by physico-chemical techniques, *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 102 (2010) 193-201.
- [230] P. Mohanachandran, P. Sindhumol, T. Kiran, Superdisintegrants: an overview, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 6 (2011) 105-109.
- [231] K. Yunomae, H. Arima, F. Hirayama, K. Uekama, Involvement of cholesterol in the inhibitory effect of dimethyl- β -cyclodextrin on P-glycoprotein and MRP2 function in Caco-2 cells, *FEBS letters*, 536 (2003) 225-231.
- [232] Q. Shen, Y. Lin, T. Handa, M. Doi, M. Sugie, K. Wakayama, N. Okada, T. Fujita, A. Yamamoto, Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by in vitro transport and in situ absorption studies, *International journal of pharmaceutics*, 313 (2006) 49-56.
- [233] J. Goole, D.J. Lindley, W. Roth, S.M. Carl, K. Amighi, J.-M. Kauffmann, G.T. Knipp, The effects of excipients on transporter mediated absorption, *International journal of pharmaceutics*, 393 (2010) 17-31.
- [234] G. Mittal, H. Carswell, R. Brett, S. Currie, M. Kumar, Development and evaluation of polymer nanoparticles for oral delivery of estradiol to rat brain in a model of Alzheimer's pathology, *Journal of Controlled Release*, 150 (2011) 220-228.
- [235] M.N. Azmin, J.F. Stuart, A.T. Florence, The distribution and elimination of methotrexate in mouse blood and brain after concurrent administration of polysorbate 80, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 14 (1985) 238-242.
- [236] A. Christiansen, T. Backensfeld, K. Denner, W. Weitschies, Effects of non-ionic surfactants on cytochrome P450-mediated metabolism in vitro, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 78 (2011) 166-172.
- [237] Z. Rao, L. Si, Y. Guan, H. Pan, J. Qiu, G. Li, Inhibitive effect of cremophor RH40 or tween 80-based self-microemulsifying drug delivery system on cytochrome P450 3A enzymes in murine hepatocytes, *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban*, 30 (2010) 562-568.
- [238] X. Ren, X. Mao, L. Cao, K. Xue, L. Si, J. Qiu, A.D. Schimmer, G. Li, Nonionic surfactants are strong inhibitors of cytochrome P450 3A biotransformation activity in vitro and in vivo, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 36 (2009) 401-411.
- [239] X. Ren, X. Mao, L. Si, L. Cao, H. Xiong, J. Qiu, A.D. Schimmer, G. Li, Pharmaceutical excipients inhibit cytochrome P450 activity in cell free systems and after systemic administration, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 70 (2008) 279-288.
- [240] L. Tompkins, C. Lynch, S. Haidar, J. Polli, H. Wang, Effects of commonly used excipients on the expression of CYP3A4 in colon and liver cells, *Pharm Res*, 27 (2010) 1703-1712.

- [241] B. Bittner, A. Guenzi, P. Fullhardt, G. Zuercher, R.C. Gonzalez, R.J. Mountfield, Improvement of the bioavailability of colchicine in rats by co-administration of D-alpha-tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate and a polyethoxylated derivative of 12-hydroxy-stearic acid, *Arzneimittel-Forschung*, 52 (2002) 684-688.
- [242] R.C. Bravo Gonzalez, J. Huwyler, I. Walter, R. Mountfield, B. Bittner, Improved oral bioavailability of cyclosporin A in male Wistar rats. Comparison of a Solutol HS 15 containing self-dispersing formulation and a microsuspension, *Int J Pharm*, 245 (2002) 143-151.
- [243] B.M. Johnson, W.N. Charman, C.J. Porter, An in vitro examination of the impact of polyethylene glycol 400, Pluronic P85, and vitamin E d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate on P-glycoprotein efflux and enterocyte-based metabolism in excised rat intestine, *AAPS pharmSci*, 4 (2002) E40.
- [244] C. Wandel, R.B. Kim, C.M. Stein, "Inactive" excipients such as Cremophor can affect in vivo drug disposition, *Clinical pharmacology and therapeutics*, 73 (2003) 394-396.
- [245] S. Rendic, F.J. Di Carlo, Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors, *Drug metabolism reviews*, 29 (1997) 413-580.
- [246] M.N. Azmin, J.F. Stuart, A.T. Florence, The distribution and elimination of methotrexate in mouse blood and brain after concurrent administration of polysorbate 80, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 14 (1985) 238-242.
- [247] T.R. Buggins, P.A. Dickinson, G. Taylor, The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition, *Advanced drug delivery reviews*, 59 (2007) 1482-1503.
- [248] E.S. Swenson, W.B. Milisen, W. Curatolo, Intestinal permeability enhancement: efficacy, acute local toxicity, and reversibility, *Pharm Res*, 11 (1994) 1132-1142.
- [249] J.M. Dintaman, J.A. Silverman, Inhibition of P-glycoprotein by D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS), *Pharm Res*, 16 (1999) 1550-1556.
- [250] M.J. Cano-Cebrian, T. Zornoza, L. Granero, A. Polache, Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: a target for drug delivery, *Current drug delivery*, 2 (2005) 9-22.
- [251] D.S. Cox, S. Raje, H. Gao, N.N. Salama, N.D. Eddington, Enhanced permeability of molecular weight markers and poorly bioavailable compounds across Caco-2 cell monolayers using the absorption enhancer, zonula occludens toxin, *Pharm Res*, 19 (2002) 1680-1688.
- [252] N.A. Motlekar, A. Fasano, M.S. Wachtel, B.B. Youan, Zonula occludens toxin synthetic peptide derivative AT1002 enhances in vitro and in vivo intestinal absorption of low molecular weight heparin, *Journal of drug targeting*, 14 (2006) 321-329.
- [253] S. Maher, T.W. Leonard, J. Jacobsen, D.J. Brayden, Safety and efficacy of sodium caprate in promoting oral drug absorption: from in vitro to the clinic, *Adv Drug Deliv Rev*, 61 (2009) 1427-1449.
- [254] M.I. Ugwoke, R.U. Agu, N. Verbeke, R. Kinget, Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives, *Adv Drug Deliv Rev*, 57 (2005) 1640-1665.
- [255] B. Mizrahi, A.J. Domb, Mucoadhesive polymers for delivery of drugs to the oral cavity, *Recent patents on drug delivery & formulation*, 2 (2008) 108-119.
- [256] E. Baloglu, Z.A. Senyigit, S.Y. Karavana, A. Bernkop-Schnurch, Strategies to prolong the intravaginal residence time of drug delivery systems, *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 12 (2009) 312-336.
- [257] S.B. Patil, K.K. Sawant, Mucoadhesive microspheres: a promising tool in drug delivery, *Current drug delivery*, 5 (2008) 312-318.
- [258] S. Chopra, S. Mahdi, J. Kaur, Z. Iqbal, S. Talegaonkar, F.J. Ahmad, Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 58 (2006) 1021-1032.

-
- [259] V.M. Leitner, M.K. Marschutz, A. Bernkop-Schnurch, Mucoadhesive and cohesive properties of poly(acrylic acid)-cysteine conjugates with regard to their molecular mass, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 18 (2003) 89-96.
- [260] V.V. Khutoryanskiy, *Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers*, *Macromolecular bioscience*, 11 (2011) 748-764.
- [261] D.B. Smith, W.H. Cook, Fractionation of carrageenin, *Arch Biochem Biophys*, 45 (1953) 232-233.
- [262] F. Acarturk, *Mucoadhesive vaginal drug delivery systems*, *Recent patents on drug delivery & formulation*, 3 (2009) 193-205.
- [263] S.S. Shidhaye, P.V. Thakkar, N.M. Dand, V.J. Kadam, Buccal drug delivery of pravastatin sodium, *AAPS PharmSciTech*, 11 (2010) 416-424.
- [264] M.C. Bonferoni, P. Chetoni, P. Giunchedi, S. Rossi, F. Ferrari, S. Burgalassi, C. Caramella, Carrageenan-gelatin mucoadhesive systems for ion-exchange based ophthalmic delivery: in vitro and preliminary in vivo studies, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 57 (2004) 465-472.
- [265] S. Sajeesh, C.P. Sharma, Novel polyelectrolyte complexes based on poly(methacrylic acid)-bis(2-aminopropyl)poly(ethylene glycol) for oral protein delivery, *Journal of biomaterials science*, 18 (2007) 1125-1139.
- [266] W.B. Chen, L.F. Wang, J.S. Chen, S.Y. Fan, Characterization of polyelectrolyte complexes between chondroitin sulfate and chitosan in the solid state, *J Biomed Mater Res A*, 75 (2005) 128-137.
- [267] A. Jintapattanakit, V.B. Junyaprasert, S. Mao, J. Sitterberg, U. Bakowsky, T. Kissel, Peroral delivery of insulin using chitosan derivatives: a comparative study of polyelectrolyte nanocomplexes and nanoparticles, *Int J Pharm*, 342 (2007) 240-249.
- [268] P. Langguth, A. Kubis, G. Krumbiegel, W. Lang, H.P. Merkle, W. Wächter, H. Spahn-Langguth, R. Weyhenmeyer, Intestinal absorption of the quaternary trospium chloride: permeability-lowering factors and bioavailabilities for oral dosage forms, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 43 (1997) 265-272.
- [269] P. Langguth, E. Mutschler, Lipophilisation of hydrophilic compounds. Consequences on transepidermal and intestinal transport of trospium chloride, *Arzneimittel-Forschung*, 37 (1987) 1362-1366.
- [270] L. Dahne, B. Baude, Method for producing core-shell (CS) particles and microcapsules using porous templates, CS particles and microcapsules, and the use thereof, in, *Google Patents*, 2011.
- [271] H.H. Ussing, K. Zerahn, Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin, *Acta Physiologica Scandinavica*, 23 (1951) 110-127.
- [272] E.G. van de Kerkhof, A.-L.B. Ungell, Å.K. Sjöberg, M.H. de Jager, C. Hilgendorf, I.A. de Graaf, G.M. Groothuis, Innovative methods to study human intestinal drug metabolism in vitro: precision-cut slices compared with Ussing chamber preparations, *Drug metabolism and disposition*, 34 (2006) 1893-1902.
- [273] M.M. Canali, L.P. Pedrotti, J. Balsinde, C. Ibarra, S.G. Correa, Chitosan enhances transcellular permeability in human and rat intestine epithelium, *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics*, 80 (2012) 418-425.
- [274] H. Lennernäs, S. Nylander, A.-L. Ungell, Jejunal permeability: a comparison between the Ussing chamber technique and the single-pass perfusion in humans, *Pharmaceutical research*, 14 (1997) 667-671.
-

-
- [275] Å. Sjöberg, M. Lutz, C. Tannergren, C. Wingolf, A. Borde, A.-L. Ungell, Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2012).
- [276] A.-L. Ungell, Transport studies using intestinal tissue ex vivo, *Cell culture models of biological barriers. In-vitro test systems for drug absorption and delivery*, (2002) 164-188.
- [277] G.M. Grass, S.A. Sweetana, In vitro measurement of gastrointestinal tissue permeability using a new diffusion cell, *Pharmaceutical research*, 5 (1988) 372-376.
- [278] D. Ghanam, P. Kleinebudde, Suitability of κ -carrageenan pellets for the formulation of multiparticulate tablets with modified release, *International journal of pharmaceutics*, 409 (2011) 9-18.
- [279] B. Jones, A. Basit, C. Tuleu, The disintegration behaviour of capsules in fed subjects: A comparison of hypromellose (carrageenan) capsules and standard gelatin capsules, *International journal of pharmaceutics*, 424 (2012) 40-43.
- [280] M. Bonferoni, G. Sandri, S. Rossi, F. Ferrari, C. Caramella, C. Aguzzi, C. Viseras, Polyelectrolyte-drug complexes of lambda carrageenan and basic drugs: Relevance of particle size and moisture content on compaction and drug release behavior, *Drug development and industrial pharmacy*, 34 (2008) 1188-1195.
- [281] E. Toorisaka, K. Watanabe, H. Ono, M. Hirata, N. Kamiya, M. Goto, Intestinal patches with an immobilized solid-in-oil formulation for oral protein delivery, *Acta Biomaterialia*, 8 (2012) 653-658.
- [282] A.E. Clausen, C.E. Kast, A. Bernkop-Schnürch, The role of glutathione in the permeation enhancing effect of thiolated polymers, *Pharmaceutical research*, 19 (2002) 602-608.
- [283] S. Van der Merwe, J. Verhoef, J. Verheijden, A. Kotze, H. Junginger, Trimethylated chitosan as polymeric absorption enhancer for improved peroral delivery of peptide drugs, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 58 (2004) 225-236.
- [284] D. Fleisher, C. Li, Y. Zhou, L.H. Pao, A. Karim, Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clinical implications, *Clin Pharmacokinetics*, 36 (1999) 233-254.
- [285] M.J. Hanley, P. Cancalon, W.W. Widmer, D.J. Greenblatt, The effect of grapefruit juice on drug disposition, *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 7 (2011) 267-286.
- [286] J.J. Leyden, Absorption of minocycline hydrochloride and tetracycline hydrochloride. Effect of food, milk, and iron, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 12 (1985) 308-312.
- [287] L.X. Yu, A.B. Straughn, P.J. Faustino, Y. Yang, A. Parekh, A.B. Ciavarella, E. Asafu-Adjaye, M.U. Mehta, D.P. Conner, L.J. Lesko, A.S. Hussain, The effect of food on the relative bioavailability of rapidly dissolving immediate-release solid oral products containing highly soluble drugs, *Molecular pharmaceutics*, 1 (2004) 357-362.
- [288] J.M. Custodio, C.Y. Wu, L.Z. Benet, Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption, *Adv Drug Deliv Rev*, 60 (2008) 717-733.
- [289] C.H. Gu, H. Li, J. Levons, K. Lentz, R.B. Gandhi, K. Raghavan, R.L. Smith, Predicting effect of food on extent of drug absorption based on physicochemical properties, *Pharm Res*, 24 (2007) 1118-1130.
- [290] K.A. Lentz, Current methods for predicting human food effect, *The AAPS journal*, 10 (2008) 282-288.
- [291] K.K. Hotha, D.V. Bharathi, S.S. Kumar, Y.N. Reddy, P.K. Chatki, L.K. Ravindranath, K.N. Jayaveera, Determination of the quaternary ammonium compound tropium in human plasma by LC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 878 (2010) 981-986.
- [292] V. Bakatselou, R.C. Oppenheim, J.B. Dressman, Solubilization and wetting effects of bile salts on the dissolution of steroids, *Pharm Res*, 8 (1991) 1461-1469.
-

- [293] E. Galia, E. Nicolaidis, D. Horter, R. Lobenberg, C. Reppas, J.B. Dressman, Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs, *Pharm Res*, 15 (1998) 698-705.
- [294] H. Lennernas, C.G. Regardh, Evidence for an interaction between the beta-blocker pafenolol and bile salts in the intestinal lumen of the rat leading to dose-dependent oral absorption and double peaks in the plasma concentration-time profile, *Pharm Res*, 10 (1993) 879-883.
- [295] F.G. Poelma, R. Breas, J.J. Tukker, Intestinal absorption of drugs. III. The influence of taurocholate on the disappearance kinetics of hydrophilic and lipophilic drugs from the small intestine of the rat, *Pharm Res*, 7 (1990) 392-397.
- [296] M. Sjöström, L. Lindfors, A.-L. Ungell, Inhibition of binding of an enzymatically stable thrombin inhibitor to luminal proteases as an additional mechanism of intestinal absorption enhancement, *Pharmaceutical research*, 16 (1999) 74-79.
- [297] K. Sugano, Estimation of effective intestinal membrane permeability considering bile micelle solubilisation, *Int J Pharm*, 368 (2009) 116-122.
- [298] L. Yang, J.P. Fawcett, J. Østergaard, H. Zhang, I.G. Tucker, Mechanistic Studies of the Effect of Bile Salts on Rhodamine 123 Uptake into RBE4 Cells, *Molecular pharmaceuticals*, 9 (2011) 29-36.
- [299] I.S. Song, M.K. Choi, Q.R. Jin, W.S. Shim, C.K. Shim, Increased affinity to canalicular P-gp via formation of lipophilic ion-pair complexes with endogenous bile salts is associated with mw threshold in hepatobiliary excretion of quaternary ammonium compounds, *Pharm Res*, 27 (2010) 823-831.
- [300] M.K. Choi, I.S. Song, D.D. Kim, S.J. Chung, C.K. Shim, Decreased biliary excretion of tributylmethyl ammonium in cholestyramine pretreated rats due to reduced formation of ion-pair complexes with hepatic bile salts, *Biopharm Drug Dispos*, 28 (2007) 485-490.
- [301] H.W. Chae, I.W. Kim, H.E. Jin, D.D. Kim, S.J. Chung, C.K. Shim, Effect of ion-pair formation with bile salts on the in vitro cellular transport of berberine, *Arch Pharm Res*, 31 (2008) 103-110.
- [302] E.M. Persson, A.S. Gustafsson, A.S. Carlsson, R.G. Nilsson, L. Knutson, P. Forsell, G. Hanisch, H. Lennernas, B. Abrahamsson, The effects of food on the dissolution of poorly soluble drugs in human and in model small intestinal fluids, *Pharm Res*, 22 (2005) 2141-2151.
- [303] F. Mashige, K. Imai, T. Osuga, A simple and sensitive assay of total serum bile acids, *Clinica Chimica Acta*, 70 (1976) 79-86.
- [304] I.S. Song, S.J. Chung, C.K. Shim, Contribution of ion pair complexation with bile salts to biliary excretion of organic cations in rats, *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 281 (2001) G515-525.
- [305] I.-S. Song, Y.-H. Han, S.-J. Chung, C.-K. Shim, Contribution of ion-pair complexation with bile salts to the transport of organic cations across LLC-PK1 cell monolayers, *Pharmaceutical research*, 20 (2003) 597-604.
- [306] D. Alvaro, A. Cantafora, A.F. Attili, S. Ginanni Corradini, C. De Luca, G. Minervini, A. Di Biase, M. Angelico, Relationships between bile salts hydrophilicity and phospholipid composition in bile of various animal species, *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 83 (1986) 551-554.
- [307] F. Nakayama, Composition of gallstone and bile: species difference, *J Lab Clin Med*, 73 (1969) 623-630.
- [308] M.K. Dhiman, A. Dhiman, K.K. Sawant, Transbuccal delivery of 5-fluorouracil: permeation enhancement and pharmacokinetic study, *AAPS PharmSciTech*, 10 (2009) 258-265.
- [309] C.N. TenHoor, V. Bakatselou, J. Dressman, Solubility of mefenamic acid under simulated fed- and fasted-state conditions, *Pharm Res*, 8 (1991) 1203-1205.

- [310] A. Radwan, G.L. Amidon, P. Langguth, Mechanistic investigation of food effect on disintegration and dissolution of BCS class III compound solid formulations: the importance of viscosity, *Biopharm Drug Dispos*, 33 (2012) 403-416.
- [311] N. Takamatsu, O.-N. Kim, L.S. Welage, N.M. Idkaidek, Y. Hayashi, J. Barnett, R. Yamamoto, E. Lipka, H. Lennernäs, A. Hussain, Human jejunal permeability of two polar drugs: cimetidine and ranitidine, *Pharmaceutical research*, 18 (2001) 742-744.
- [312] C. Meaney, C. O'Driscoll, A comparison of the permeation enhancement potential of simple bile salt and mixed bile salt: fatty acid micellar systems using the CaCo-2 cell culture model, *International journal of pharmaceutics*, 207 (2000) 21-30.
- [313] S. Şenel, D. Duchene, A. Hıncal, Y. Capan, G. Ponchel, In vitro studies on enhancing effect of sodium glycocholate on transbuccal permeation of morphine hydrochloride, *Journal of Controlled Release*, 51 (1998) 107-113.
- [314] M. Thanou, J. Verhoef, H. Junginger, Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives, *Advanced drug delivery reviews*, 52 (2001) 117-126.
- [315] B. Obermeier, P. Langguth, H. Frey, Partially Quarternized Amino Functional Poly (methacrylate) Terpolymers: Versatile Drug Permeability Modifiers, *Biomacromolecules*, 12 (2010) 425-431.
- [316] N. Kanikkannan, S. Andega, S. Burton, R. Babu, M. Singh, Formulation and in vitro evaluation of transdermal patches of melatonin, *Drug development and industrial pharmacy*, 30 (2004) 205-212.
- [317] G. Schladitz-Keil, H. Spahn, E. Mutschler, Determination of the bioavailability of the quaternary compound trospium chloride in man from urinary excretion data, *Arzneimittel-Forschung*, 36 (1986) 984.
- [318] G. Schladitz-Keil, H. Spahn, E. Mutschler, Fluorimetric determination of the quaternary compound trospium and its metabolite in biological material after derivatization with benoxaprofen chloride, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 345 (1985) 99-110.
- [319] M. Thanou, J. Verhoef, H. Junginger, Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers, *Advanced drug delivery reviews*, 50 (2001) S91-S101.
- [320] J. Pappenheimer, Paracellular intestinal absorption of glucose, creatinine, and mannitol in normal animals: relation to body size, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 259 (1990) G290-G299.
- [321] E.K. Anderberg, P. Artursson, Epithelial transport of drugs in cell culture. VIII: Effects of sodium dodecyl sulfate on cell membrane and tight junction permeability in human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Journal of pharmaceutical sciences*, 82 (1993) 392-398.
- [322] S. Hong, P.R. Leroueil, E.K. Janus, J.L. Peters, M.-M. Kober, M.T. Islam, B.G. Orr, J.R. Baker, M.M. Banaszak Holl, Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability, *Bioconjugate chemistry*, 17 (2006) 728-734.
- [323] V.R. Vemula, V. Lagishetty, S. Lingala, Solubility enhancement techniques, *International journal of pharmaceutical sciences review and research*, 5 (2010) 41-51.
- [324] N.G. Schipper, S. Olsson, J.A. Hoogstraate, A.G. deBoer, K.M. Varum, P. Artursson, Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement, *Pharm Res*, 14 (1997) 923-929.
- [325] P. Artursson, K. Palm, K. Luthman, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Advanced drug delivery reviews*, 46 (2001) 27-43.
- [326] T. Mariappan, S. Singh, Evidence of efflux-mediated and saturable absorption of rifampicin in rat intestine using the ligated loop and everted gut sac techniques, *Molecular pharmaceutics*, 1 (2004) 363-367.
- [327] R. Wasserman, A. Taylor, Intestinal absorption of phosphate in the chick: effect of vitamin D3 and other parameters, *The Journal of nutrition*, 103 (1973) 586-599.

- [328] Y. Zheng, Z. Zuo, A.H. L Chow, Lack of effect of β -cyclodextrin and its water-soluble derivatives on in vitro drug transport across rat intestinal epithelium, *International journal of pharmaceutics*, 309 (2006) 123-128.
- [329] U. Karbach, Segmental heterogeneity of cellular and paracellular calcium transport across the rat duodenum and jejunum, *Gastroenterology*, 100 (1991) 47.
- [330] A. Merzlikine, C. Rotter, B. Rago, J. Poe, C. Christoffersen, V.H. Thomas, M. Troutman, A. El-Kattan, Effect of chitosan glutamate, carbomer 974P, and EDTA on the in vitro Caco-2 permeability and oral pharmacokinetic profile of acyclovir in rats, *Drug development and industrial pharmacy*, 35 (2009) 1082-1091.

8. Anhang

8.1. Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien

VetSpec™ Gallensäure-Satz, Catachem, USA

Mit dem Satz ist es möglich, die Gesamtmenge an Gallensäure in einer Flüssigkeit zu bestimmen. Der Satz enthält:

Gallensäuren Enzym Farb Reagenz (R1)

Ein Liter enthält

Puffer (keine genauen Herstellerangaben)

Nitrotetrazoliumblau 0,6 mmol

3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase \geq 800 Einheiten/l

Diaphorase \geq 5000 Einheiten/l

Stabilisatoren und nichtreaktive Stoffe (keine genauen Herstellerangaben)

Gallensäuren Aktivator Reagenz (R2)

NAD 6,0 mmol

Stabilisatoren und nichtreaktive Stoffe (keine genauen Herstellerangaben)

Gallensäuren Kalibrier Reagenz

Enthält Gallensäuren in einer exakten Konzentration von 100 μ mol/l.

8.2. Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Hank's balanced salt solution (HBSS)

	mg/l
NaCl	8000
Glukose	1000
KCl	400
NaHCO ₃	350
MgCl ₂ x 7 H ₂ O	200
CaCl ₂	140
KH ₂ PO ₄	60
Na ₂ HP0 ₄	48

Phosphate buffered saline (PBS) mit Calcium und Magnesium

	mg/l	
NaCl	8000	
Na ₂ HPO ₄	1150	
KCl	200	
KH ₂ PO ₄	200	
CaCl ₂	100	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O		100

Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer (KBR) mit NaHCO₃ und CaCl₂

	mg/l	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O		100
KCl	340	
NaCl	7000	
Na ₂ HPO ₄	100	
NaH ₂ PO ₄	180	
Glukose	1800	
NaHCO ₃	1260	
CaCl ₂	139	

8.3. Pharmakokinetische Parameter aus den Experimenten mit Eudragit E

	b1 [1/min]	b2 [1/min]	t1/2 (b1) [min]	t1/2 b2 [min]	k31 [1/min]	k1e [1/min]	k13 [1/min]	t_lag [min]	MRT_tot [min]	MRT_disp [min]
i.v. 1	12,6	0,0361	0,0551	19,2	0,134	3,38	9,1	4,52	24,9	20,4
i.v. 2	14	0,0661	0,0495	10,5	0,286	3,24	10,5	1,98	13,7	11,7
i.v. 3	1,05	0,0661	0,662	10,5	0,276	0,25	0,586	3,69	16,2	12,5
i.v. 4	0,303	0,035	2,28	19,8	0,0799	0,133	0,126	4,65	24	19,4
MW	6,98825	0,050825	0,76165	15	0,193975	1,75075	5,078	3,71	19,7	16
	b1 [1/min]	b2 [1/min]	t1/2 (b1) [min]	t1/2 b2 [min]	k31 [1/min]	k1e [1/min]	k13 [1/min]	k00 [1/min]	k60 [1/min]	k01 [1/min]
Loop ohne 1	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	0,0279	0,0198	99
Loop ohne 2	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	0,059	0,00131	99
Loop ohne 3	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	0,00162	0,0216	99
Loop ohne 4	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	0,0158	0,0157	99
MW	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	0,02608	0,0146025	99
Loop mit 1	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	8,16	0,262	99
Loop mit 2	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	9,91	0,128	99
Loop mit 3	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	21,9	0,0887	999
Loop mit 4	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	21,9	0,0887	999
MW	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	15,4675	0,14185	549
po ohne 1	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	3,56	0,0124	99
po ohne 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
po ohne 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
po ohne 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MW	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	3,56	0,0124	99
po mit 1	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	0,328	0,00564	99
po mit 2	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	0,143	0,00564	99
po mit 3	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	0,286	0,00564	99
po mit 4	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	66,6	0,294	99
MW	0,224	0,00692	3,09	100	0,00927	0,167	0,0544	16,83925	0,07773	99

Anhang

	t_lag [min]	t_lag 2 [min]	MRT_tot [min]	MRT_disp [min]	MRT_abs [min]	Vss/f	Vc/f	V3/f	Clearance/f
Loop ohne 1	0,001	286	173	41,1	132	332	48,3	283	8070
Loop ohne 2	0,00104	306	67,4	41,1	26,3	2320	337	1980	56400
Loop ohne 3	7	245	605	41,1	564	753	110	643	18300
Loop ohne 4	0,00117	80,1	156	41,1	115	2820	410	2410	68600
MW	1,7508025	229,275	250,35	41,1	209,325	1556,25	226,325	1329	37842,5
Loop mit 1	1,43	58,2	81,4	41,1	40,3	923	134	789	22500
Loop mit 2	1,82	234	211	41,1	170	613	89,2	523	14900
Loop mit 3	4,99	45,1	58,1	41,1	17	104	15,1	88,5	2520
Loop mit 4	4,99	45,1	58,1	41,1	17	104	15,1	88,5	2520
MW	3,3075	95,6	102,15	41,1	61,075	436	63,35	372,25	10610
po ohne 1	4,87	170	252	41,1	211	2150	313	1840	52400
po ohne 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
po ohne 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
po ohne 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MW	4,87	170	252	41,1	211	2150	313	1840	52400
po mit 1	6,95	111	321	41,1	321	280	24	141	4020
po mit 2	4,52	200	372	41,1	331	1390	202	1180	33700
po mit 3	6,95	111	279	41,1	238	394	57,3	336	9580
po mit 4	4,87	115	142	41,1	101	1620	236	1390	39500
MW	5,8225	134,25	278,5	41,1	247,75	921	129,825	761,75	21700

Anhang

	C(0)*f	a1	AUC_model [ng/ml*min]	1. Tmax [min] model	Cmax [ng/ml] model	1. Tmax [min] Messung	Cmax [ng/ml] Messung	Dosage [mg]
i.v. 1	-	-	-	-	-	-	-	0,250
i.v. 2	-	-	-	-	-	-	-	0,253
i.v. 3	-	-	-	-	-	-	-	0,255
i.v. 4	-	-	-	-	-	-	-	0,254
MW	-	-	-	-	-	-	-	0,253
Loop ohne 1	207	0,679	1240	11	13,3	5	17,7	2,60
Loop ohne 2	29,7	0,991	177	8,27	4,87	5	4,88	2,63
Loop ohne 3	91,3	0,817	546	257	1,76	300	1,09	2,57
Loop ohne 4	24,4	0,352	146	92,7	1,13	120	0,843	2,54
MW	88,1	0,70975	527,25	92,2425	5,265	107,5	6,12825	2,59
Loop mit 1	74,5	0,36	445	1,9	22,4	5	28,3	2,52
Loop mit 2	112	0,298	671	2,23	30,7	5	17	2,51
Loop mit 3	664	0,9	3970	5,2	4,85	5	0,387	2,56
Loop mit 4	664	0,766	3970	5,2	4,85	5	232	2,60
MW	378,625	0,581	2264	3,6325	15,7	5	69,42175	2,55
po ohne 1	31,9	0,158	191	5,71	4,21	5	1,76	2,65
po ohne 2	0	-	0	-	0	-	0	2,67
po ohne 3	0	-	0	-	0	-	0	2,56
po ohne 4	0	-	0	-	0	-	0	2,52
MW	7,975	0,158	47,75	5,71	1,0525	5	0,44	2,60
po mit 1	416	0,0315	2490	130	9,58	360	19,7	2,61
po mit 2	49,6	0,128	297	10,1	1,86	5	0,387	2,65
po mit 3	175	0,183	1040	10,9	13,3	15	9,92	2,54
po mit 4	42,3	0,158	253	119	15,1	120	14,7	2,70
MW	170,725	0,12513	1020	67,5	9,96	125	11,17675	2,63

9. Publikationen und Posterpräsentationen

C. Heinen, S. Reuss, G. L. Amidon and P. Langguth

“Ion pairing with bile salts modulates intestinal permeability and contributes to food-drug interaction of BCS class III compound trospium chloride”

Molecular Pharmaceutics 2013, 2013 Jul 12

C. Heinen, S. Reuss, S. Saaler-Reinhardt and P. Langguth

„Mechanistic basis for unexpected bioavailability enhancement of polyelectrolyte complexes incorporating BCS class III drugs and carrageenans”

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2013 Sep;85(1):26-33

7th world meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology
Valletta 2010, Malta, 8.8.-11.3.2010, Poster Präsentation

C. Heinen, S. Reuss, S. Saaler-Reinhardt and P. Langguth

“Negative Food Effect of Cationic Drugs – Mechanisms and Absorption Enhancement
Using Trospium Chloride as Model Compound”

10. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Geboren am 02.06.1979 in Rodalben

Berufliche Tätigkeiten

Seit 03.2008

Johannes Gutenberg-Universität Mainz – Institut für Pharmazie und Biochemie – Abteilung Biopharmazie und pharmazeutische Technologie

Wissenschaftlicher Mitarbeiter

Dissertation über das Thema: Einfluss pharmazeutischer Hilfsstoffe auf die Bioverfügbarkeit von BCS Klasse 3 Substanzen

02.2007-11.2007

Eberhard Karls-Universität Tübingen – Fachbereich Pharmazie und Biochemie – Abteilung Pharmakologie

Wissenschaftlicher Mitarbeiter

Untersuchung des renalen Phenotyps einer Maus mit genetischer Ablation des SK4 Kanals

Ausbildung

02.2007

Diplomarbeit: Pelliclebildung in Weichgelatinekapselform: Einfluss des Hilfsstoffes Dimethylsorbitol sowie Vergleich verschiedener Pellicleinhibitoren

05.2006 – 10. 2006

Praktikum bei der **Novartis Pharma AG / Basel**
Abteilung Special Delivery Systems

11.2005 – 04. 2006

Praktikum **Marien-Apotheke Rodalben**

04.2000 – 10. 2005

Universität des Saarlandes, Studium der Pharmazie

07.1998 – 08. 1999

Zivildienstleistender Malteser Hilfsdienst Pirmasens

07.1989 – 06. 1998

Immanuel Kant-Gymnasium Pirmasens

07.1987– 06. 1989

Grundschule Horebschule Pirmasens

07.1985– 06. 1987

Grundschule Mozartschule Rodalben