

**Interaktionen von Losartan und seinem
Hauptmetaboliten EXP 3174 mit
Membrantransportern in vitro, in situ und in vivo:
Affinitäts- und Transportparameter und ihre
Abhängigkeit von experimentellen Bedingungen sowie
von der Anwesenheit ausgewählter Inhibitoren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von

Cornelia Dreßler

geboren am 10. Mai 1973 in Freiberg/Sachsen

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. H. Spahn-Langguth**
- 2. Prof. Dr. P. Nuhn**
- 3. Prof. Dr. G. Baktir**

Halle/Saale, 12.07.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000003648

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003648>]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Pharmakologische Eigenschaften des Angiotensin-II-Antagonisten Losartan	1
1.1.1. Metabolismus	1
1.1.2. Pharmakodynamik	3
1.1.3. Pharmakokinetik	8
1.1.4. Einfluss intestinaler Transporter auf die Absorption von Losartan	9
1.2. Das intestinale Epithel als Absorptionsbarriere	9
1.2.1. Parazellulärer Transport	12
1.2.2. Transzellulärer Transport	12
1.2.2.1. Passive transzelluläre Diffusion	12
1.2.2.2. Transzelluläre vesikuläre Transzytose/Endozytose	12
1.2.2.3. Carrier-vermittelter Transport	13
1.2.3. Transporter - Allgemeine Aspekte und Charakterisierung ausgewählter Transportsysteme	13
1.2.3.1. Monocarbonsäuretransporter (MCT)	15
1.2.3.2. Oligopeptidtransporter (PepT1)	16
1.2.3.3. Transporter der Multidrug-Resistenz	17
1.2.3.3.1. P-Glykoprotein (P-GP)	17
1.2.3.3.2. Multidrug resistance-associated Protein (MRP)	19
1.2.3.3.3. Organischer Kationentransporter (OCT)	20
1.3. Pharmakokinetische Interaktionen unter besonderer Berücksichtigung der Absorption	21
1.3.1. Allgemeine Aspekte	21
1.3.2. Beispiele für Interaktionen basierend auf der Wechselwirkung mit Makromolekülen	22
1.3.2.1. Beeinflussung der metabolischen Clearance als Interaktionsmechanismus	22
1.3.2.2. Wechselwirkungen an Transportern als Ursache pharmakokinetischer Interaktionen	23
2. Problemstellung	25
3. Ergebnisse	27
3.1. In-vitro-Untersuchungen mit Caco-2-Zellen	27
3.1.1. Radioligandenbindungsassay	27
3.1.1.1. Beeinflussung der Bindung des Radioliganden durch Lösungsmittel und pH-Wert	27
3.1.1.2. Verdrängung des Radioliganden durch P-GP-Substrate	28
3.1.1.2.1. Affinitätsbestimmungen durch Verdrängungsexperimente	28

3.1.1.3.	Korrelation des IC ₅₀ -Wertes mit dem log D-Wert.....	29
3.1.2.	Transportstudien durch Caco-2-Zellmonolayer	30
3.1.2.1.	Einfluss der Kulturdauer auf den Transport von Modellsubstanzen	30
3.1.2.1.1.	Betrachtung elektrophysiologischer Parameter (TEER)	30
3.1.2.1.2.	Charakterisierung von Modellsubstanzen	31
3.1.2.2.	Transportstudien mit Losartan und EXP 3174.....	32
3.1.2.2.1.	Richtungsabhängigkeit des Transportes	32
3.1.2.2.2.	Effekt von Verapamil auf den Transport von Losartan und EXP 3174.....	33
3.2.	In-situ-Perfusionsstudien	35
3.2.1.	Effektive Permeabilität von Losartan und EXP 3174 ohne bzw. bei Anwesenheit von Inhibitoren verschiedener intestinaler Transportsysteme bzw. Inhibitoren von Biotransformationsprozessen	35
3.2.1.1.	Untersuchungen mit Losartan und EXP 3174	35
3.2.2.	Beeinflusst die Tageszeit den intestinalen Substanztransport?	37
3.2.2.1.	Perfusionen mit dem P-GP-Modellsubstrat Talinolol und dem Angiotensin-II-Antagonisten Losartan.....	37
3.3.	In-vivo-Untersuchungen	39
3.3.1.	Pharmakokinetische Studien in vivo an der Ratte.....	39
3.3.1.1.	Pharmakokinetische Parameter nach intravenöser Applikation von Losartan bzw. EXP 3174.....	40
3.3.1.1.1.	Kinetische Analyse der Konzentrations-Zeit-Profile	40
3.3.1.1.2.	Bestimmung in der Gallenflüssigkeit	42
3.3.1.2.	Pharmakokinetische Parameter nach peroraler Applikation von Losartan bzw. EXP 3174.....	43
3.3.1.2.1.	Kinetische Analyse der Konzentrations-Zeit-Profile	43
3.3.1.2.2.	Bestimmung in der Gallenflüssigkeit	46
3.3.2.	Verteilungsstudie	48
3.3.2.1.	Einfluss des P-GP-Modulators Verapamil auf das Verteilungsverhalten von Losartan und EXP 3174.....	48
4.	Diskussion	55
4.1.	Bindungsassay und Bindungsdaten	55
4.1.1.	Entwicklung.....	55
4.1.2.	Datengewinnung (IC ₅₀ -Werte)	56
4.2.	In-vitro- und In-situ-Transportstudien	56
4.2.1.	Caco-2-Zellmonolayer	56
4.2.1.1.	Kulturzeit und P _{eff} -Werte	56
4.2.1.2.	Permeabilitätsdaten von Losartan und EXP 3174	57
4.2.2.	In-situ-Perfusionen	57
4.2.2.1.	Permeabilitätsbestimmungen.....	57
4.2.2.2.	Transporthemmung.....	58
4.2.2.3.	Zirkadiane Veränderungen in der Permeabilität	58
4.3.	Kinetische Studien am Ganztier.....	59
4.3.1.	Charakterisierung relevanter kinetischer Parameter	59
4.3.2.	Einfluss des P-GP-Inhibitors Verapamil auf die Absorption und Disposition von Losartan und EXP 3174	60
4.4.	Prädiktiver Wert von In-vitro-Studien	61

5. Materialien und Methoden.....	62
5.1. In-vitro-Untersuchungen an Caco-2-Zellen.....	62
5.1.1. Radioligandenbindungsassay	62
5.1.1.1. Chemikalien und Geräte	62
5.1.1.1.1. Chemikalien.....	62
5.1.1.1.2. Geräte.....	63
5.1.1.2. Caco-2-Zellpräparation	63
5.1.1.3. Bindungsassay.....	64
5.1.1.4. Kalkulationen	65
5.1.2. Transportstudien mit Caco-2-Zellmonolayern	65
5.1.2.1. Chemikalien und Geräte	65
5.1.2.1.1. Chemikalien.....	65
5.1.2.1.2. Geräte.....	66
5.1.2.2. Zellkultur.....	67
5.1.2.3. Transportstudien	67
5.1.2.4. Permeabilitätsberechnung	70
5.2. In-situ-Rattendarmperfusionen.....	70
5.2.1. Chemikalien und Geräte.....	70
5.1.1.1. Chemikalien	70
5.1.1.2. Geräte	71
5.2.2. Chirurgischer Eingriff und Perfusionsbedingungen.....	71
5.2.3. Design der Perfusionen	72
5.2.3.1. 1-Stufen-Perfusion - Ermittlung der effektiven Permeabilitäten.....	72
5.2.3.2. 2-Stufen-Perfusion - Beeinflussung der P_{eff} -Werte durch potentielle Inhibitoren für Transporter	73
5.2.3.3. 3-Stufen-Perfusion - Vergleich der P_{eff} -Werte für Losartan und Talinolol bei Perfusionen zu unterschiedlichen Tageszeiten: Testung von Transporthemmern und Bestimmung der hemmbaren Fraktion am Tag und in der Nacht.....	73
5.2.4. Berechnungen	74
5.2.4.1. Wassertransport.....	74
5.2.4.2. Intestinale Permeabilität.....	74
5.3. In-vivo-Untersuchungen.....	74
5.3.1. Chemikalien und Geräte.....	74
5.3.1.1. Chemikalien	74
5.3.1.2. Geräte	75
5.3.2. Kinetikuntersuchungen.....	75
5.3.2.1. Studiendesign	75
5.3.2.1.1. Intravenöse Applikation	75
5.3.2.1.2. Perorale Applikation	76
5.3.2.2. Pharmakokinetische Auswertung	76
5.3.3. Verteilungsstudien.....	78
5.3.3.1. Studiendesign	78
5.3.3.2. Datenanalyse	79
5.4. HPLC-Analytik	79
5.4.1. Chemikalien und Geräte.....	79
5.4.1.1. Chemikalien	79
5.4.1.2. Geräte	80
5.4.2. Bioanalytische Bestimmung von Losartan und EXP 3174.....	81

5.4.2.1.	Chromatographische Bedingungen	81
5.4.2.2.	Probenvorbereitung.....	83
5.4.2.2.1.	Proben aus In-vitro-Transportstudien	83
5.4.2.2.2.	Proben aus In-situ-Untersuchungen.....	83
5.4.2.2.3.	Proben aus In-vivo-Untersuchungen.....	83
5.4.2.3.	Validierung	83
5.4.2.3.1.	Selektivität	84
5.4.2.3.2.	Linearität	84
5.4.2.3.3.	Präzision und Richtigkeit	85
5.4.2.3.4.	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	86
5.4.3.	Enantioselektive Bestimmung von Talinolol	86
5.4.3.1.	Chromatographische Bedingungen	86
5.4.3.2.	Probenvorbereitung.....	87
5.4.3.2.1.	Proben aus In-situ-Untersuchungen.....	87
5.4.3.3.	Validierung	87
5.5.	Statistische Auswertung.....	88
6.	Zusammenfassung.....	89
7.	Literaturverzeichnis	91
Anhang	XI
A.	Rohdaten der In-vitro-Studien mit Caco-2-Zellen.....	XI
A.1.	Bindungsstudien	XI
A.2.	Transportexperimente durch Caco-2-Zellmonolayer	XIX
B.	Rohdaten der In-situ-Perfusionsstudien.....	XXV
B.1.	In-situ-Perfusionen mit Losartan	XXV
B.2.	In-situ-Perfusionen mit EXP 3174.....	XXXV
B.3.	Tageszeitliche Effekte bei In-situ-Perfusionen.....	XLV
C.	Rohdaten der In-vivo-Studien	L
C.1.	Pharmakokinetische Untersuchungen	L
C.2.	Verteilungsstudien	LXVII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturformel von Losartan	1
Abbildung 2:	Schema der oxidativen Biotransformation von Losartan zum aktiven Carbonsäuremetaboliten EXP 3174	2
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der physiologischen und pharmakologischen Interaktionen innerhalb des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems	4
Abbildung 4:	Schematische Darstellung eines AT _{1A} -Rezeptors	5
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des intestinalen Epithels sowie der Transportmechanismen durch die Absorptionsbarriere	11
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des Monocarbonsäuretransporters MCT1	16
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des Oligopeptidtransporters PepT1	17
Abbildung 8:	Schematische Darstellung des P-Glykoproteins mit Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen sowie relevanten Bindungsstellen für Antikörper und ATP	18
Abbildung 9:	Veränderung der ³ H-Talinololbindung an P-GP durch Lösungsmittelzusätze und pH-Veränderungen	27
Abbildung 10:	Bindung des Radioliganden ³ H-Talinolol in Verdrängungsexperimenten mit Talinolol unter Zusatz verschiedener Lösungsmittel sowie bei pH-Veränderungen des Inkubationspuffers	28
Abbildung 11:	Konzentrationsabhängige Verdrängung des Radioliganden ³ H-Talinolol zur Berechnung der IC ₅₀ -Werte von Verapamil, Talinolol, Alprenolol, Losartan und EXP 3174	29
Abbildung 12:	Korrelation von Lipophilie und P-GP-Affinität: log D- vs. IC ₅₀ -Werte	30
Abbildung 13:	Entwicklung des transepithelialen elektrischen Widerstandes von Caco-2-Zellmonolayern innerhalb des Kulturzeitraumes	31
Abbildung 14:	Abhängigkeit der Permeabilität von Modellsubstanzen durch Caco-2-Zellmonolayer von der Kulturperiode	32
Abbildung 15:	Einfluss von Verapamil auf den Transport von Losartan und EXP 3174 durch Caco-2-Zellmonolayer unterschiedlicher Passagen	34
Abbildung 16:	Einfluss der Kulturdauer von Caco-2-Zellmonolayern unterschiedlicher Passagen und des P-GP-Inhibitors Verapamil auf das Efflux ratio der Permeabilitäten von Losartan und EXP 3174	34
Abbildung 17:	Prozentuale Veränderung der intestinalen Permeabilität von Losartan und EXP 3174 bei Coperfusion mit Inhibitoren verschiedener intestinaler Transportsysteme	36
Abbildung 18:	Einfluss der Tageszeit auf die effektiven intestinalen Permeabilitäten von Losartan und Talinolol mit und ohne Zusatz von Vinblastin als P-GP-Inhibitor	39
Abbildung 19:	Individuelle und mittlere Blutkonzentrations-Zeit-Profile nach <u>intravenöser</u> Applikation von Losartan bzw. EXP 3174 [3 mg/kg KG]: Nichtkanülierte vs. Gallengangs-kanülierte Ratten	41
Abbildung 20:	Individuelle und mittlere Blutkonzentrations-Zeit-Profile nach <u>peroraler</u> Applikation von Losartan bzw. EXP 3174 [10 mg/kg KG]: Nichtkanülierte vs. Gallengangs-kanülierte Ratten	45
Abbildung 21:	Nachweis von Losartan und EXP 3174 in der Gallenflüssigkeit: Individuelle und mittlere kumulative biliäre Ausscheidung von Losartan und EXP 3174 nach <u>intravenöser</u> [3 mg/kg KG] und <u>peroraler</u> Applikation [10 mg/kg KG]	47
Abbildung 22:	Konzentrations-Zeit-Kurven von Losartan, EXP 3174 in Blut und Ileum mit und ohne Comedikation von Verapamil nach i.v.- und p.o.-Gabe von Losartan bzw. EXP 3174	48
Abbildung 23:	TBR nach 120 und 360 Minuten für Losartan und EXP 3174 mit und ohne Coadministration von Verapamil nach <u>intravenöser</u> Gabe von Losartan bzw. EXP 3174	50

Abbildung 24:	TBR nach 120 und 360 Minuten für Losartan und EXP 3174 mit und ohne Coadministration von Verapamil nach <u>peroraler</u> Gabe von Losartan bzw. EXP 3174.....	51
Abbildung 25:	Schematische Darstellung der In-situ-Rattendarmperfusion.....	73
Abbildung 26:	Chemische Struktur des Zorbax CN-Säulenmaterials zur chromatographischen Trennung von Losartan, EXP 3174 und Benoxaprofen.....	65
Abbildung 27:	Repräsentative HPLC-Chromatogramme der Trennung von Losartan, EXP 3174 mit dem internen Standard Benoxaprofen in verschiedenen biologischen Matrices	66
Abbildung 28:	Chemische Struktur des ChiraSpher NT-Säulenmaterials zur chiralen chromatographischen Trennung von Talinolol und Pindolol	70
Abbildung 29:	Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von Talinolol mit dem internen Standard Pindolol im In-situ-Darmperfusat.....	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht der mittleren pharmakokinetischen Parameter von Losartan und dem aktiven Metaboliten EXP 3174 nach peroraler Einmalapplikation von 50 mg Losartan in gesunden europäischen und japanischen Probanden	9
Tabelle 2:	Faktoren, die die Resorption und Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen beeinflussen können.....	10
Tabelle 3:	Familie der SLC-Transporter (solute carrier family): Kurzübersicht ausgewählter Subfamilien und deren Liganden.....	14
Tabelle 4:	Familie der ABC-Transporter (ATP-binding cassette family): Kurzübersicht der Subfamilien und deren Liganden.....	15
Tabelle 5:	Übersicht der IC ₅₀ -Werte, erhalten aus Ergebnissen der Verdrängungsexperimente mit ausgewählten Arzneistoffen mit ³ H-Talinolol als Radioligand, und der log D-Werte, basierend auf Literaturangaben.....	28
Tabelle 6:	Richtungsabhängigkeit des Transportes von Losartan und EXP 3174 durch Caco-2-Zellmonolayer	33
Tabelle 7:	Veränderung der intestinalen Permeabilität von Losartan und EXP 3174 bei Coperfusion mit Inhibitoren verschiedener Transportsysteme	35
Tabelle 8:	Tageszeitliche Unterschiede und prozentuale Veränderungen der intestinalen Permeabilitäten von Losartan und Talinolol nach In-situ-Perfusionen mit verschiedenen P-GP-Inhibitoren	38
Tabelle 9:	Übersicht kinetischer Parameter nach nichtkompartimenteller Analyse der <u>Blutdaten</u> nach <u>intravenöser</u> Losartan- bzw. EXP 3174-Applikation.....	42
Tabelle 10:	Übersicht kinetischer Parameter nach nichtkompartimenteller Analyse der <u>Galledaten</u> (kumulative Ausscheidung) nach <u>intravenöser</u> Losartan- bzw. EXP 3174-Applikation.....	43
Tabelle 11:	Übersicht kinetischer Parameter nach nichtkompartimenteller Analyse der <u>Blutdaten</u> nach <u>peroraler</u> Losartan- bzw. EXP 3174-Applikation	44
Tabelle 12:	Übersicht kinetischer Parameter nach nichtkompartimenteller Analyse der <u>Galledaten</u> (kumulative Ausscheidung) nach <u>peroraler</u> Losartan- bzw. EXP 3174-Applikation.....	46
Tabelle 13:	Mittlere AUD-Werte nach i.v.- und p.o.-Applikation von Losartan bzw. EXP 3174 mit und ohne Comedikation von Verapamil.....	49
Tabelle 14:	Relative Veränderung der Gewebe-zu-Blut-Verteilungsverhältnisse (Tissue-to-blood ratio's (TBR)) mit der Zeit für Losartan und EXP 3174: Vergleich i.v.- und p.o.-Applikation von Losartan bzw. EXP 3174 mit und ohne Comedikation von Verapamil.....	53
Tabelle 15:	Zusammensetzung der für die Transportversuche verwendeten Zellkulturmedien	54
Tabelle 16:	Übersicht zum Studiendesign der Transportstudien mit Caco-2-Zellmonolayern	55
Tabelle 17:	Design der Applikation der Verteilungsstudie mit Losartan und EXP 3174 mit und ohne Coadministration von Verapamil	68
Tabelle 18:	Parameter für die verwendeten Kalibrierfunktionen von Losartan und EXP 3174 der jeweiligen Matrix nach linearer Regressionsanalyse	68
Tabelle 19:	Daten zur Präzision und Richtigkeit während des Analysenprozesses für die Bestimmung von Losartan und EXP 3174 in unterschiedlichen, zum Teil biologischen Matrices	69

Abkürzungen

a-b	Transport von apikal nach basolateral in polarisierten Zellen
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACN	Acetonitril
Ae	kumulative Wirkstoff- bzw. Substanzausscheidung (amount excreted)
AT ₁ bzw. AT ₂	Angiotensin-II-Rezeptorsubtypen 1 bzw. 2
ATE	Atenolol
ATP	Adenosintriphosphat
AUD	Fläche unter den Datenpunkten (area under the data)
AUC _{0-∞}	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, gegen Unendlich extrapoliert (area under the curve)
AUMC	Fläche unter der ersten Momentkurve (area under the first moment curve)
b-a	Transport von basolateral nach apikal in polarisierten Zellen
S-BAC	S-Baclofen
BENZ	Benzoessäure
BHS	Blut-Hirn-Schranke
¹⁴ C	Radiokohlenstoff, radioaktives Kohlenstoff-Isotop
Caco-2	humane Colocarzinom-Zelllinie
CAGE	Chymostatin-empfindliches Angiotensin-II-bildendes Enzym (chymostatin-sensitive Angiotensin-II generating enzyme)
CALC	Calcein
CL	Clearance
CL _{bil}	biliäre Clearance
CL _{tot}	totale Clearance
C _{max}	maximale gemessene Konzentration in Blut (oder Plasma oder Serum)
cMOAT	kanalikulärer multispezifischer organischer Anionentransporter (canalicular multispecific organic anion transporter)
COFF	Coffein
CYP	Cytochrom-P-450
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPM	Zerfälle pro Minute (disintegration per minute)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
EXP	EXP 3174 (Hauptmetabolit von Losartan)
F	absolute Bioverfügbarkeit
FBS	Fötales bovines Serum (fetal bovine serum)
FS	Freisetzung
ggf	gegebenenfalls
GIT	Gastrointestinaltrakt
GSH	Glutathion
h	Stunde (hora)

^3H	tritiierter Wasserstoff
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
λ	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante
l	Liter
INDO	Indometacin
LAT	großer neutraler Aminosäuretransporter (large neutral amino acid transporter)
LLC-PK1	polarisierte Nierenepithelzellen (porcine kidney cells)
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantitation)
LOS	Losartan
M	Molarität
MAN	Mannitol
μCi	Mikrocurie
MCT	Monocarbonsäuretransporter (monocarboxylic acid transporter)
MDCK	Madin-Darby Kaninchennierenzellen (Madin-Darby canine kidney cells)
MDR	Multidrug-Resistenz (multidrug resistance)
MeOH	Methanol
MES	Morpholinoethansulfonsäure
METO	Metoprolol
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
m/m	Gewicht pro Gewicht
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
MRP	multidrug resistance-associated protein
MRP1	multidrug resistance-associated protein 1
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2 (cMOAT)
MRT	mittlere Verweilzeit (mean residence time)
MTBE	Methyl-tert.-butylether
MW	Mittelwert
N	Normalität
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NEA	nichtessentielle Aminosäuren (non essential amino acids)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar

OCT	organischer Kationentransporter
P	Passage
P_{app}	apparente Permeabilität
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
P_{eff}	effektive Permeabilität
PEG400	Polyethylenglycol 400
PepT1	intestinaler Protonen/Oligopeptid-Symporter
P-GP	P-Glykoprotein
pH	potentia hydrogenii
PHE	L-Phenylalanin
p.o.	peroral
PP	Polypropylen
PROB	Probenecid
PROP	Propranolol
PSC	PSC 833
r	Korrelationskoeffizient
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RL	Radioligand
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
TALI	Talinolol
TAU	Taurin
TBR	Verhältnis der Gewebekonzentration zur Blutkonzentration (Tissue-to-blood ratio; Maß für die Gewebeselektivität)
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand (transepithelial electrical resistance)
THF	Tetrahydrofuran
$t_{1/2}$	terminale Eliminationshalbwertszeit
t_{max}	Zeit bis zum Erreichen der maximalen Wirkstoffkonzentration
TP	Transporter
U	Einheiten (units)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
VBL	Vinblastin
V_D	Verteilungsvolumen (volume of distribution)
VERA	Verapamil
v/v	Volumen pro Volumen
vs.	versus
Wo	Wochen
z.T.	zum Teil

Wohin uns das Leben führt ist ungewiß.

Es wird uns Freude und Trauer, Gutes und Böses auf unserem Lebensweg begleiten.

Wir werden mit vielen Schwierigkeiten, Widersprüchen und Unsicherheiten konfrontiert, so daß wir uns für den richtigen Weg entscheiden, wenn wir uns von unserem Glauben und unserer Wahrheit leiten lassen.

N. M.

Danksagung

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und zum Teil am Institut für Biopharmazie und Technologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in Deutschland bzw. bei AstraZeneca in Mölndal (Schweden), am Department of Drug Metabolism und Pharmacokinetics durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank aussprechen:

Professor Hildegard Spahn-Langguth, die mir mit der interessanten Themenstellung die Möglichkeit gegeben hat, die vorliegende Arbeit anzufertigen und selbständig und interdisziplinär zu arbeiten. Durch ihr entgegengebrachtes Vertrauen, die vielen Hinweise, anregenden Diskussionen, den unermüdlichen Forschergeist und ihre Sachkenntnis eröffnete sie mir einen interessanten Weg in der pharmazeutischen Welt der Wissenschaft, nicht zuletzt durch die Gelegenheit zu mehreren Forschungsaufenthalten im In- und Ausland.

Professor Peter Langguth für seine Hilfe und Unterstützung bei der Organisation und Durchführung eines Teils der In-vivo-Kinetikstudien in Mölndal, aber auch bei der Schaffung der Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis in Mainz die Bindungsstudien fortführen zu können.

Professor Carl-Gunnar Regardh für die Möglichkeit, die hervorragenden Arbeits- und Laborbedingungen bei AstraZeneca in Mölndal nutzen zu dürfen und damit die kurze Zeit dort so effektiv wie nur möglich gestalten zu können.

Professor Hartmut Derendorf für seine Hilfestellung bei der Erlernung verschiedenster pharmakokinetischer Auswerteverfahren und die nette Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe an der University of Florida in Gainesville.

Professor Peter Nuhn für die Förderung, seine guten Ratschläge und Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Dr. Abeer Hanafy, für das Einarbeiten in die In-situ-Perfusionstechnik sowie ihre unkomplizierte Kompetenz und Hilfsbereitschaft in allen tierexperimentellen Arbeiten, aber auch die nie endende, strapazierbare Geduld bei allen Fragen zu Ägypten.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bioanalytik mit deren Hilfe und Zusammenarbeit es möglich wurde, die vielen Höhen und Tiefen zu meistern und das manchmal Unmögliche in kurzer Zeit doch noch möglich zu machen. Aber auch für die konstruktive Kritik, die vielen Ratschläge und die moralische Unterstützung, die so die Promotionszeit, auch außerhalb der Wissenschaft, zu einer Bereicherung werden ließ.

Sybille Neuhoff für ihren Einsatz bei der Einarbeitung in die Prinzipien der Zellkultur, Transport- und Bindungsstudien sowie ihre Gastfreundschaft in Schweden, die auch mit zum Erfolg des Forschungsaufenthaltes beitrugen.

Dem Land Sachsen-Anhalt für die Unterstützung in Form eines Stipendiums im Rahmen des Graduiertenförderungsgesetzes.

Meinen Eltern, die mir mit ihrer Unterstützung und endlosen Zuversicht stets den Auftrieb gaben, der zur Meisterung der kleinen und großen Katastrophen im Leben nötig ist und damit einen hervorragenden Grundstein für mein Leben schufen.

1. Einleitung

Angiotensin II, der aktive Mediator des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), ist verantwortlich für eine Vielzahl von physiologischen Effekten. Dies schließt die Gefäßkontraktion, die Aldosteronsekretion, die Catecholaminfreisetzung, die Glykogenolyse sowie die Abnahme der renalen Filtration und Myoproliferation im Herzen und vaskulären Geweben (Bouley 1998) ein. Die Entwicklung von selektiven Liganden in den 80-iger Jahren erlaubte die Identifizierung von zwei Angiotensin-II-Rezeptorsubtypen, die als AT₁ und AT₂ bezeichnet wurden. Verantwortlich für die Haupteffekte des Peptids Angiotensin ist der AT₁-Rezeptor, der mit Losartan interagiert (Chiu 1989). Der AT₂-Rezeptor ist durch CGP42112 und PD123177 hemmbar (Whitebread 1989, Chang 1990).

1.1. Pharmakologische Eigenschaften des Angiotensin-II-Antagonisten Losartan

Der erste nichtpeptidgerge Angiotensin-II-Rezeptorantagonist Losartan (Abbildung 1), ein Imidazolderivat mit einer Diphenyltetrazolgruppe (Timmermans 1993, Wong 1990 (1)), wurde 1988 in den DuPont Merck Research Laboratories (USA) entdeckt und entwickelt.

Losartan, das Natriumsalz von 2-Butyl-4-chlor-1-{4-[2-(1*H*-tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl}imidazol-5-methanol, wurde zur Leitsubstanz in der Entwicklung weiterer AT₁-Rezeptorantagonisten, deren gemeinsames Strukturmerkmal der Biphenyltetrazolring ist. Der Losartan-Imidazolring wurde durch Integration anderer Heterozyklen variiert (Soldner 1996 (1)).

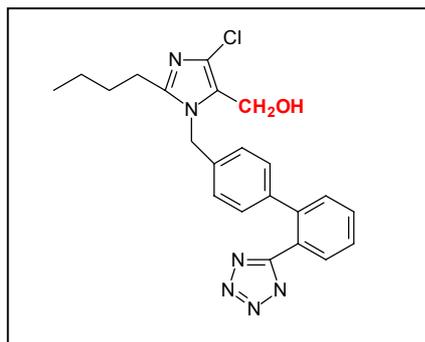


Abbildung 1:
Strukturformel von Losartan

Spektroskopische Untersuchungen (Infrarot-, Raman- und ¹³C-NMR-Spektroskopie) zum Polymorphismus von Losartan ergaben zwei enantiotrope Formen, die identische chemische Strukturen aufweisen und sich nur in der Kristallstruktur unterscheiden. Es wurde eine bei niedrigeren und eine bei höheren Temperaturen stabile Form (Schmelzpunkte: Form I: 229,5°C; Form II: 273,2°C) gefunden (Raghavan 1993). Die Form I ist bei Raumtemperatur thermodynamisch stabiler und schwerer löslich als Form II (Crocker 1997), die sich durch exothermische Vorgänge (Einfrieren) in die stabilere Form I umwandeln lässt (Wu 1993). Die Ionisationskonstante der Verbindung (pK_a 5,6) ist auf den aciden Stickstoff im Tetrazolring zurückzuführen. Losartan hat einen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (log D) von 1,19, und ist gut löslich in Wasser (100 mg/ml), Methanol und Dimethylsulfoxid, hingegen unlöslich in Säure (Ribadeneira 1996).

1.1.1. Metabolismus

Stearns (1992) untersuchte den Biotransformationsmechanismus von Losartan, sowie die antagonistische Rezeptoraktivität der Metabolite in Inkubationen mit Ratten-, Affen-, und Humanlebergewebehomogenat. Losartan wird nach Resorption zur pharmakologisch aktiveren und länger wirkenden Verbindung EXP 3174 metabolisiert (Christ 1994).

In Ratten führt die Hauptroute des oxidativen Metabolismus von Losartan zu sieben entweder monohydroxylierten oder oxidierten Metaboliten (Carbonsäuren), während in Affen die Glucuronidierung des Tetrazolringes dominierend bei der Bildung von 5 Metaboliten ist. Bei Inkubationen in humanen Lebergeweben wurden drei Hauptwege für den Losartanmetabolismus gefunden:

- 1) Oxidation des Alkohols zur Carbonsäure EXP 3174
- 2) Monohydroxylierung der Butylseitenkette und
- 3) Glucuronidierung des Tetrazolringes, wobei sich annähernd gleiche Anteile von oxidierten und glucuronidierten Produkten ergaben (Stearns 1992, 1995).

Es wird vermutet, dass die Oxidation des Angiotensin-II-Antagonisten Losartan zu EXP 3174 in zwei Schritten abläuft (Abbildung 2):

- 1) ein langsamer erster Schritt (Oxidation des Losartans zum intermediären Aldehyd (E 3179)) über eine Hydratzwischenstufe, der die Geschwindigkeit bestimmt, und
- 2) ein - im Vergleich schneller - nachfolgender Schritt (Oxidation des intermediären Aldehyds E 3179 zur Carbonsäure EXP 3174 unter Sauerstoffeinlagerung) (Stearns 1995).

Für die Carbonsäure EXP 3174, den einzigen aktiven Metaboliten, wird eine mehr als 10-fach höhere Aktivität als bei der Muttersubstanz angenommen. Heute ist EXP 3174 als Hauptmetabolit von Losartan in Ratten und im Menschen allgemein anerkannt und wird für die ausgeprägte und langanhaltende Losartanwirkung zumindest mitverantwortlich gemacht (Wong 1990 (3)).

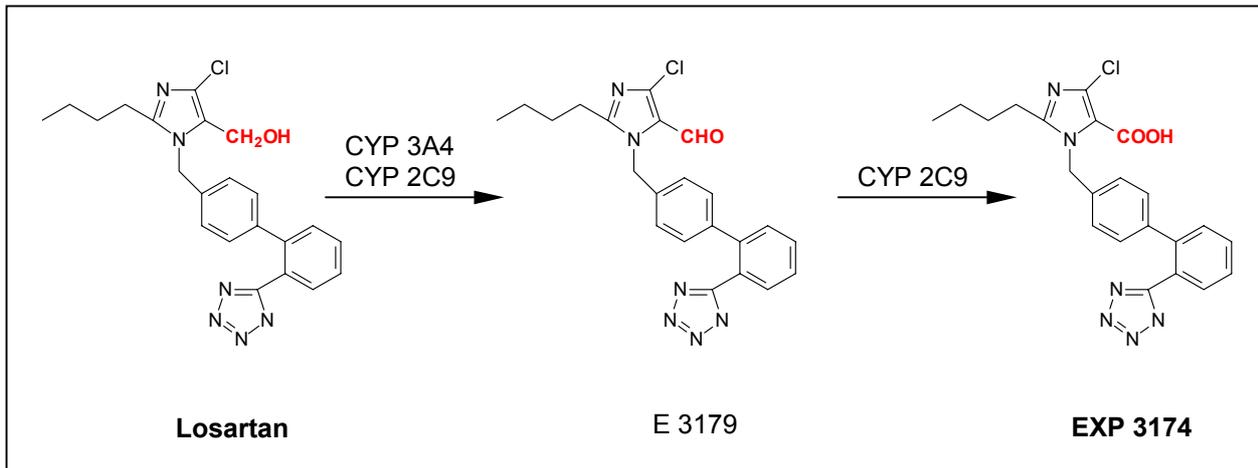


Abbildung 2: Schema der oxidativen Biotransformation von Losartan zum aktiven Metaboliten, der Carbonsäure EXP 3174, über die Aldehydzwischenstufe (nach Stearns 1995)

In-vitro-Untersuchungen von Stearns (1995) zeigten, dass Losartan in Humanlebermikrosomen in Gegenwart von molekularem Sauerstoff und bei Vorhandensein von NADPH durch die Cytochrom-P-450-2C- und 3A-Subfamilien zu EXP 3174 biotransformiert wird (Stearns 1995). Es wurde nachgewiesen, dass der Metabolismus hauptsächlich durch die Isoenzyme CYP2C9 und CYP3A4 erfolgt. Sandwall (1999) konnte in *In-vivo*-Studien zeigen, dass weder CYP2A6, CYP2D6 noch CYP2E1 in den Metabolismus von Losartan zu EXP 3174 involviert sind. Für CYP2C9 wurde der größte Effekt nachgewiesen, gefolgt von CYP2C19, das durch ähnliche IC₅₀-Werte charakterisiert ist wie CYP3A4. CYP1A2 nahm beim Vergleich der IC₅₀-Werte eine Zwischenstellung ein (Sandwall 1999). In den *In-vitro*-Experimenten wurde durch Zusatz von Gestoden bzw. Ketoconazol die Oxidation zu EXP 3174 vollständig gehemmt, was zeigt, dass in diesem Falle CYP3A4 den Hauptanteil an der Biotransformation des Losartans zu EXP 3174 besitzt (Stearns 1995, Yun 1995). Durch Zusatz von Sulfaphenazol wurde ebenfalls eine Hemmung der Biotransformation erreicht, was darauf schließen lässt, dass auch CYP2C9 in die Biotransformation involviert ist. Yasar (2001) bestätigte diesen Befund und wies *in vivo* nach, dass verschiedene CYP2C9-Varianten (Genotyp CYP2C9*X/*Y; X: 1-3; Y: 1-3) unterschiedlich stark am Abbau beteiligt sind. Eine Kombination von Sulfaphenazol und Gestoden führte zu einer maximalen Hemmung des Losartanabbaus (97%) (Meadowcroft 1999). *In-vitro*-Untersuchungen an Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* ergaben hingegen, dass in diesem Testsystem CYP2C9 den Hauptanteil an der Biotransformation von Losartan besitzt (Yasar 2001).

In-vivo-Studien mit potenten CYP3A4-Inhibitoren führten hingegen nicht zu einer signifikanten Hemmung der Biotransformation. Der Zusatz von Cimetidin führte zu einem Anstieg der AUC von 18% bei Losartan, die AUC für EXP 3174 blieb bei Comedikation dagegen unverändert (Goldberg 1995). Ketoconazol und Erythromycin, im Vergleich zum Cimetidin potentere Hemmer des CYP3A4, führten zu keiner Veränderung der AUC von Losartan und EXP 3174 (McCrea 1996, Williamson 1998). Fluconazol, ein CYP2C9- und CYP3A4-Inhibitor, hingegen führte zu einer Abnahme der AUC von Losartan und einer 66%-igen Hemmung der EXP 3174-Bildung (Kazierad 1997). Im Rahmen von Untersuchungen zur Induktion mit nichtspezifischen Induktoren führte eine Induktion mit Rifampicin bzw. Phenobarbital zu einer Reduktion der AUC von Losartan und EXP 3174 (Goldberg 1996, Williamson 1998). Ebenso

ergaben Arzneistoff-Interaktionsstudien mit Fluvastatin, einem potenten CYP2C9-Inhibitor, keine signifikante Veränderung der pharmakokinetischen Parameter (Meadowcroft 1999). Man nimmt daher heute an, dass beide Isoenzyme (CYP2C9 und CYP3A4) gehemmt sein müssen, um eine deutliche Auswirkung auf die AUC von EXP 3174 zu erzielen.

1.1.2. Pharmakodynamik

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des arteriellen Blutdrucks sowie bei der Aufrechterhaltung des Flüssigkeits- und Elektrolytgleichgewichtes (Abbildung 3). Ebenso wird dem RAAS in der Pathogenese und Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen eine herausragende Rolle beigemessen.

Die Kaskade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), das zur Generation von Angiotensin II und zur Aktivierung des Angiotensin-II-Rezeptors führt, kann an verschiedenen Stellen beeinflusst werden. Reninantagonisten und Angiotensin converting enzyme (ACE)-Hemmer führen zu einer Inhibition der Bildung von Angiotensin I bzw. Angiotensin II aus den entsprechenden Vorstufen, außerdem wird durch die Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten die Wirkung des Angiotensin II auf Rezeptorebene unterbunden (Burnier 1996).

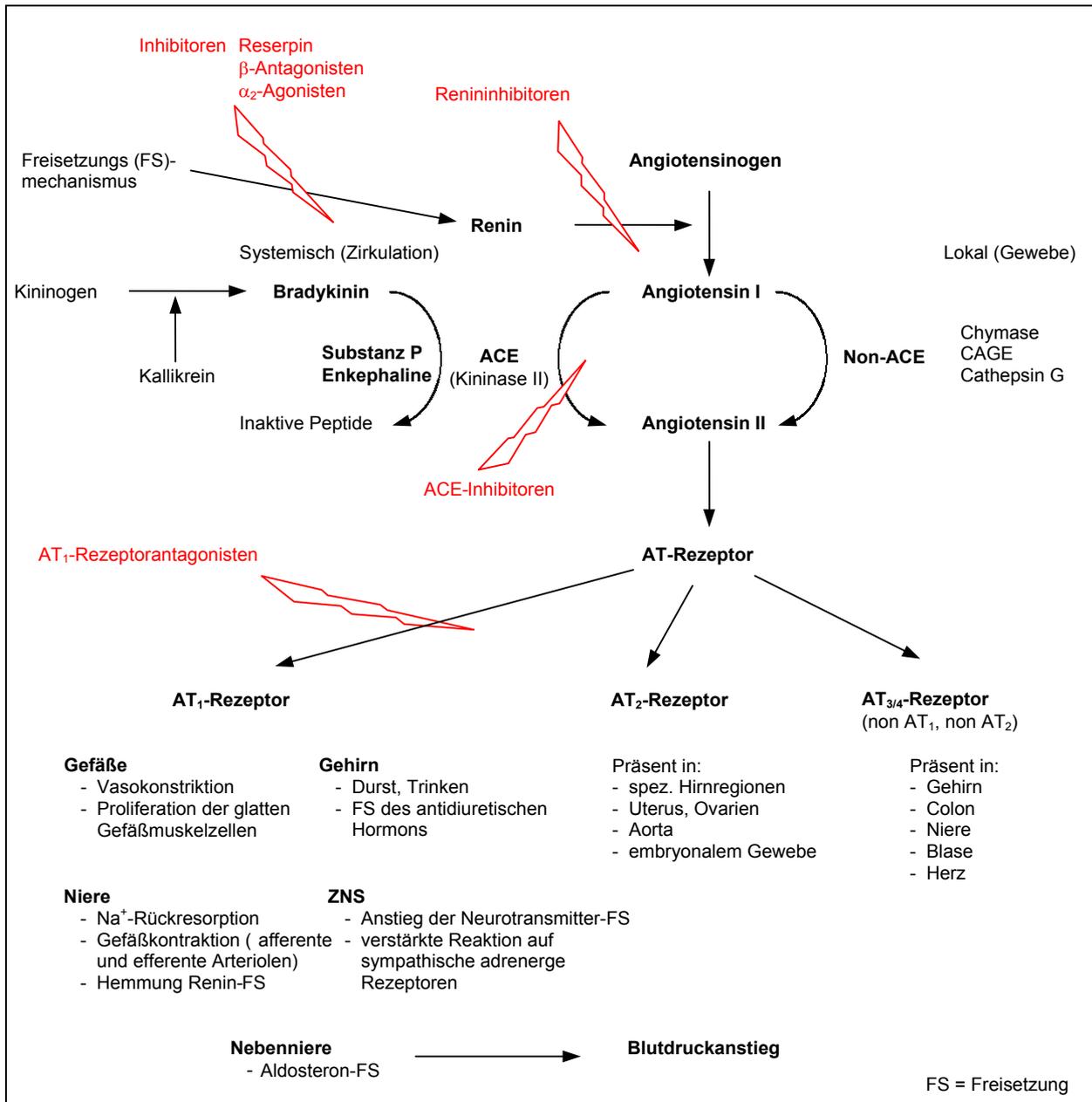


Abbildung 3: Schematische Darstellung der physiologischen und pharmakologischen Interaktionen innerhalb des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (modifiziert nach Carr 1996, De Gasparo 2000).

Die enzymatische Kaskade dieses Systems spielt eine bedeutende Rolle in der Blutdruckregulation. Angiotensin II, der primäre Mediator des Systems, übt seine Effekte durch die Stimulation spezifischer Rezeptoren an Targetorganzellen aus. Vor einigen Jahren war eine pharmakologische Hemmung des RAAS nur durch Renininhibitoren, ACE-Inhibitoren bzw. β-Antagonisten möglich. Mit den AT₁-Rezeptorantagonisten wurde eine Substanzklasse entwickelt, mit der eine spezifische Inhibition möglich ist und bedingt durch das minimale metabolische Interaktionspotential auch die Nebenwirkungsrate sehr gering ist.

Das Oktapeptid Angiotensin II (Asp¹-Arg-Val-Tyr-Ile/Val-His-Pro-Phe⁸) gehört zu den wirksamsten körpereigenen Substanzen, die eine Vasokonstriktion und somit einen Blutdruckanstieg verursachen. Die Entdeckung des Rezeptors für dieses Peptid war richtungsweisend für ein neues Therapieprinzip zur Behandlung der essentiellen Hypertonie.

Von dem entsprechenden Rezeptor (Abbildung 4) sind heute mehrere Subtypen bekannt, die als AT₁-, AT₂- und AT_{3/4}- Rezeptor bezeichnet werden (De Gasparo 2000).

Der Angiotensin AT₁-Rezeptor vermittelt alle physiologischen Wirkungen des Angiotensin II auf kardiovaskulärer, renaler, neuronaler, endokriner und hepatischer Ebene und gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Eingeschlossen hiervon sind die Regulation des Blutdruckes, des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes, von Durst, der Hormonsekretion und die Regulation der Nierenfunktion.

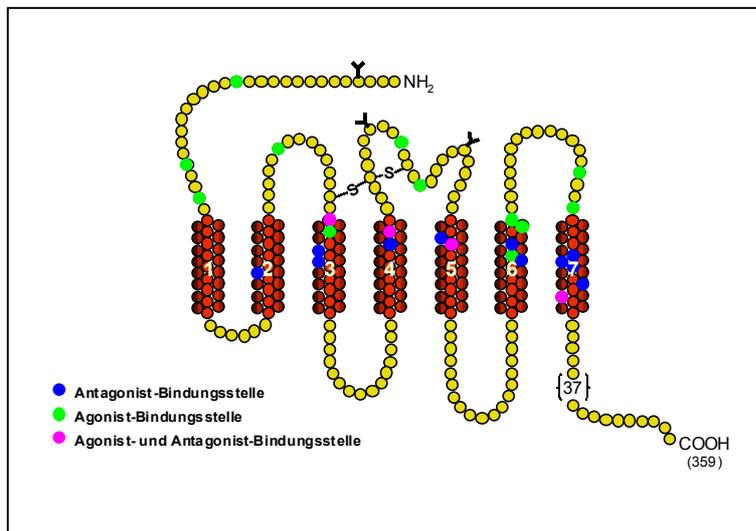


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines AT_{1A}-Rezeptors (nach De Gasparo 2000)

Die Angiotensin-II-Bindung an den Rezeptor induziert eine Konformationsänderung im Rezeptormolekül, was eine Interaktion mit G-Proteinen fördert und die Signaltransduktion über verschiedene Plasmamembran-Effektorsysteme vermittelt. Die zelluläre Reaktion auf AT₁-Rezeptorsignale führt zu Kontraktionen der glatten Muskulatur, neuronaler Aktivierung, Aldosteronsekretion sowie zu Zellwachstum und -proliferation. Einige der Konsequenzen der AT₁-Rezeptoraktivierung werden kompensiert durch den strukturell ähnlichen AT₂-Rezeptor, der die Effekte des AT₁-vermittelten Wachstums z.B. in Endothelzellen antagonisiert.

Die genetische Information für den AT₁-Rezeptor ist beim Menschen auf dem Chromosom 3 lokalisiert. In Ratten und Mäusen wurden zwei Subtypen des AT₁-Rezeptors gefunden (AT_{1A} und AT_{1B}), deren Information auf dem Chromosom 17 lokalisiert ist. Der AT_{1A}-Rezeptorsubtyp befindet sich in der Lunge, Leber, Niere, Herz, Aorta und der glatten Muskulatur der Gefäße, aber nicht im Gehirn. Die Nebenniere, Hypophyse, Gehirn und der Uterus sind Hauptorte für das Vorkommen des AT_{1B}-Rezeptors (Kim 2000).

Das Gen für die Expression des AT₂-Rezeptors ist sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte auf dem X-Chromosom (Mensch: Chromosom 22, Ratte: Chromosom 3) lokalisiert. Im Gegensatz zum AT₁-Rezeptor wurden keine Subtypen identifiziert. Der AT₂-Rezeptor ist in embryonalem Gewebe zu finden, wobei die AT₂-Rezeptorexpression nach der Geburt sehr schnell abnimmt. Beim Erwachsenen ist der AT₂-Rezeptor im Uterus, Ovarien, Herz und bestimmten Hirnregionen zu finden. Ebenso wie der AT₁-Rezeptor ist der AT₂-Rezeptor aus sieben transmembranären Domänen aufgebaut, die Art und Weise der Signalübertragung ist aber bislang noch nicht geklärt (Menz 1999 (1), (2)). Er besitzt Einfluss auf die Zelldifferenzierung und das Zellwachstum (Timmermanns 1993, Matsubara 1998, Horiuchi 1999) und induziert den programmierten Zelltod (Apoptose) (Yamada 1996). Ebenso hemmt der AT₂-Rezeptor das AT₁-Rezeptor-vermittelte Zellwachstum und demonstriert somit eine funktionelle antagonistische Wirkung gegenüber dem AT₁-Rezeptor.

Losartan ist der erste oral wirksame Angiotensin-II-Rezeptorantagonist, der 1995 als Antihypertonikum in Deutschland zugelassen wurde. Diese Klasse von Verbindungen eröffnete durch selektive Blockade des Angiotensin-II-Rezeptors einen völlig neuen therapeutischen Weg für den Eingriff in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Als kompetitiver AT₁-selektiver Antagonist greift Losartan spezifisch an den AT_{1(A)}-Rezeptoren an, die am Herzen, auf den glatten Gefäßmuskelzellen und in der Niere lokalisiert sind (Hunyady 1996).

Mutationsanalysen des AT₁-Rezeptor zeigen, dass die Bindungsstelle der nichtpeptidergen Antagonisten auf die Region zwischen den transmembranären Regionen begrenzt ist, ohne essentielle Beteiligung von extrazellulären Domänen (Ji 1994, Schambye 1994 (1), (2), Hunyady 1996). Mehrere Aminosäuren, die bedeutsam für die Losartanbindung sind, sind auf der dritten und siebten transmembranären Helix und andere in den Helices 2, 4, 5 und 6 lokalisiert.

Eine Klassifikation der nichtpeptidergen AT₁-Rezeptorantagonisten in zwei Haupttypen (kompetitiv und nichtkompetitiv) ist hinsichtlich ihrer Interaktion mit dem Agonisten am Rezeptor möglich. Bindet der Antagonist und der Agonist in derselben oder in einer überlappenden Membranregion, so spricht man von

einem kompetitiven Liganden (Losartan). Führt die Bindung des Antagonisten in der intramembranären Helix hingegen zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, so dass der Agonist keine Bindungsmöglichkeit hat, spricht man von einer nichtkompetitiven Hemmung (EXP 3174) (Chung 1998).

In In-vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass Losartan 10000 mal selektiver an den AT₁-Rezeptor bindet als an den AT₂-Rezeptor (Chiu 1990). Studien an Rattenmikrosomen aus Nebennierenrinde und glatten Muskelzellen der Aorta zeigten, dass Losartan die spezifische Bindung von [¹²⁵I]-Angiotensin II zum AT₁-Rezeptor in einer monophasischen, konzentrationsabhängigen Weise mit einem IC₅₀-Wert (Inhibitorkonzentration bei 50% Verdrängung des Radioliganden) von $1\text{-}2\cdot 10^{-8}$ mol/l hemmt (Chiu 1990, Sachinidis 1993). Im Gegensatz dazu wurden für Losartan am AT₂-Rezeptor IC₅₀-Werte von 10^{-4} mol/l ermittelt (Chiu 1990). Der aktive Metabolit EXP 3174 besitzt eine 10-fach höhere Affinität zum AT₁-Rezeptor als die Muttersubstanz, wobei die IC₅₀-Werte bei $1,4\cdot 10^{-9}$ mol/l liegen. Diese Werte sind abhängig von den jeweiligen Versuchsbedingungen, insbesondere von dem prozentualen Proteingehalt im Inkubationspuffer und den verwendeten Geweben. Die Charakterisierung der Aktivität des Losartan zeigt, dass die 5-Carbonsäure von Losartan, EXP 3174, deutlich zu der In-vivo-Gesamtaktivität des Losartan beiträgt. Jedoch ist Losartan nicht als Prodrug anzusehen, da es selbst ein potenter Angiotensin-II-Antagonist ist (Lo 1995).

In Konzentrationen von mehr als 10^{-5} mol/l konnte für Losartan in Rattengewebe keine Affinität zu anderen Rezeptortypen wie z.B. α_1 -Adrenozeptor im Gehirn und Ca²⁺-Rezeptor im Herzmuskel bzw. für andere Rezeptoren (Neurotensin-, Glycin-, Opiat-, Muskarin-, Dopamin-, Serotonin-Rezeptor) in verschiedenen isolierten Gewebepreparationen, nachgewiesen werden (Goa 1996).

In-vitro-Untersuchungen von Raiden (1997) zeigten, dass Losartan außerdem in der Lage ist, die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten durch N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) zu hemmen. Dieser Effekt beruht aber nicht darauf, dass Losartan den AT₁-Rezeptor antagonisiert, denn weder mit Saralasin (AT₁- und AT₂-Rezeptorinhibitor) noch mit Captopril (ACE-Hemmer) sind diese Effekte reproduzierbar. Ebenso wird die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch fMLP ausgelöst und nicht durch exogen zugeführtes Angiotensin II. Scatchard-Analysen zeigten, dass Losartan ohne Beeinflussung der Anzahl der Bindungsstellen die Affinität von fMLP deutlich senkt (Raiden 1997). Beobachtungen aus klinischen Studien ergaben aber kein erhöhtes Risiko der mit Losartan behandelten Patienten, an bakteriellen Infektionen zu erkranken, sofern deren Immunsystem normal arbeitet. Möglicherweise sind diese Effekte nur bei Patienten mit einer Immunschwäche ausgeprägt (Goodfriend 1996).

Für die Bewertung der Wirkungsdauer sowie der Losartaneffekte auf den Blutdruck, die Herzrate und kardiovaskuläre Hypertrophie, die renalen hämodynamischen und tubulären Effekte, sowie den Einfluss auf die Harnsäureausscheidung können heute bereits umfassende klinische Erfahrungen herangezogen werden. Die meisten Untersuchungen wurden sowohl an gesunden Probanden als auch an Patienten mit Bluthochdruck durchgeführt (Soldner 1996 (1)).

Die selektiven und kompetitiven inhibitorischen Effekte von Losartan, bezogen auf die Angiotensin-II-vermittelte Blutdruckregulation und die Zellwachstumsstimulation, z.B. die Abhängigkeit der antagonistischen Reaktion des Losartan auf das aktivierte RAAS, wurden in verschiedenen experimentellen Designs getestet, welche sich alle auf den AT₁-Rezeptorsubtyp konzentrierten (DeGraaf 1993).

Bei normotensiven Ratten hemmt Losartan dosisabhängig periphere (die Aldosteron- und die adrenale Catecholaminsekretion) und zentrale Effekte (Wasseraufnahme und Blutdruckregulation), die durch Angiotensin II induziert werden (Wong 1990 (4), 1991). In Renin-hypertensiven Ratten senkt Losartan nach peroraler Applikation über einen Zeitraum von 24 Stunden den Blutdruck ohne Beeinflussung der Herzrate (Wong 1990 (2)).

In zwei Studien mit gesunden (normotensiven) Probanden (Munafò 1992, Christen 1991) wurde nach peroraler Losartangabe (Einfach- und Mehrfachdosierung) die Hemmung des Blutdruckresponse auf exogene Unterschiede in der AT₁- und AT₂-Expression geschätzt. Nach einer Applikation von 5 mg Losartan wurde kein Effekt gefunden, bei einer Gabe von 10-40 mg (70% der Höchstdosis) fand eine dosisabhängige Hemmung statt. Dosierungen von 80-120 mg führten zu einem Plateau, wobei nach wiederholter Gabe keine kumulative Erhöhung des blockierenden Effektes beobachtet werden konnte. Der Zeitverlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Losartan und EXP 3174 lässt vermuten, dass die Hemmung des Blutdruckresponse weitestgehend durch den langwirksamen Metaboliten bedingt ist (>25% Hemmung in 24 Stunden).

Eine signifikante Senkung des Plasma-Aldosterons konnte bei gesunden Probanden nach Losartangabe nicht nachgewiesen werden, es wurde aber ein Reboundeffekt nach 24 Stunden sowohl nach Einmal- als auch nach Mehrfachapplikation ermittelt (Goldberg 1993). Bei normotensiven Personen mit Salzangel-Diät wurde nach Losartangabe eine Senkung des Blutdruckes gefunden, hingegen konnte bei erhöhten Salzkonzentrationen kein Effekt des Losartans auf den Blutdruck nachgewiesen werden (Doig 1995).

Die glomeruläre Filtrationsrate und der renale Blutfluss veränderten sich bei Losartanapplikation an gesunden Freiwilligen nicht signifikant (Csajka 1997).

Perorale Dosisfindungsstudien mit Einfach- und Mehrfachapplikation an normotensiven Probanden zeigten, dass Losartan gut toleriert wird und einen messbaren dosisabhängigen Angiotensin-II-antagonistischen Effekt über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Losartanapplikation besitzt (Johnston 1995). Dieser wird vor allem durch den aktiven Metaboliten EXP 3174 erklärt. In diesem Zusammenhang wurden in der Regel Losartandosen von 40-80 mg untersucht, die bekanntermaßen einen Maximaleffekt auslösen (>90% Blockade). Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurde dagegen eine Dosis von 25 mg Losartan als optimal beschrieben (Soldner 1996 (1)). Diese Dosisfindung erfolgte unter Beachtung der vasodilatierenden und neurohormonalen Effekte von Losartan. In einer anderen großangelegten Studie wurde festgestellt, dass eine Dosis von 50 mg Losartan eine ähnliche blutdrucksenkende Wirkung erreicht, wie sie bei Gabe einer 20 mg-Dosis von Enalapril auftritt (Wong 1990 (2)).

Bei hypertensiven Patienten wurde nach Losartangabe (50 mg täglich) eine stärkere Blutdrucksenkung erreicht als nach täglicher Captoprildosierung von 50 mg/d (Mallion 1995). Weder nach täglicher Applikation von 50 mg Losartan noch von Atenolol konnten signifikante Unterschiede im Ausmaß der Blutdrucksenkung gefunden werden (Dahlöf 1995).

Ergebnisse einer plazebokontrollierten Multicenterstudie zeigten außerdem, dass die hämodynamische Wirkung von Losartan bei Patienten mit mittelschwerer symptomatischer Herzinsuffizienz und einer Auswurfraction von weniger als 40% günstig beeinflusst wird. In dieser Studie wurde nach zwölfwöchiger Behandlung mit 50 mg Losartan nachgewiesen, dass der systemische Gefäßwiderstand, der pulmonale Kapillardruck, der Blutdruck, die Aldosteronkonzentration und die Herzfrequenz gesenkt werden konnten, hingegen das Herzzeitvolumen und die Renin- und Angiotensin-II-Spiegel zunahmten (Timmermanns 1995, Crozier 1995).

Unter Monotherapie wird sehr häufig keine ausreichende Blutdrucksenkung erreicht, so dass auf die kombinierte Anwendung mehrerer Antihypertonika zurückgegriffen wird. So ermöglicht die Kombination eines ACE-Hemmers mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten eine vollständige RAAS-Blockade und besitzt demnach einen Nutzen für die Therapie der Hypertonie und Herzinsuffizienz (Azizi 1997 (1), (2)). Ebenso wurde eine additive Blutdrucksenkung bei Kombination von Losartan mit dem Thiazid-Diuretikum Hydrochlorothiazid nachgewiesen (MacKay 1996, Weber 1995), die nach 3 Wochen stärker war als nach einer Woche (Csajka 1997). Die Kombination mit Calciumkanal- und β -Blockern lässt ebenfalls einen additiven Effekt erwarten.

Im Vergleich zu den ebenfalls bei Hypertonie sehr oft eingesetzten ACE-Hemmern liegt bei einer Losartantherapie die Inzidenz an trockenem Reizhusten zu erkranken, nur bei rund 3% der Patienten, da Losartan die bradykininpotenzierende Wirkung fehlt. Das ACE, das identisch mit der Kininase II (zuständig für den Bradykininabbau) ist, wird nicht gehemmt und es kommt zu keinem Anstieg des Bradykininspiegels, der mit der Entstehung des Reizhustens in Zusammenhang gebracht wird. (Wong 1990 (2)). Im Allgemeinen ist die Nebenwirkungsrate der Angiotensin-II-Antagonisten im Vergleich zu ACE-Hemmern geringer (Soldner 1996 (2)).

Unter Losartantherapie wird eine Abnahme der Serumharnsäure (<0,4 mg/dl) beobachtet (Sasaki 1996). In In-vitro-Untersuchungen an humanen sowie an Ratten-Brush-Border-Membranvesikeln wurde eine urikosurische Wirkung von Losartan durch kompetitive Hemmung des Ureat-Anionenaustauschers im proximalen Tubulus erreicht (Edwards 1996, Roch-Ramel 1997). Im Gegensatz dazu wird die Harnsäureausscheidung durch den aktiven Metaboliten EXP 3174 und andere Angiotensin-II-Antagonisten nicht erhöht (Doig 1995). Gerade im Hinblick auf eine Kombinationstherapie mit Thiazid-Diuretika, die die Serumharnsäurespiegel erhöhen, ist dieser Effekt von Losartan wünschenswert, denn eine Hyperurikämie gilt als schwacher, wenn auch unabhängiger, kardiovaskulärer Risikofaktor.

In den letzten Jahren konnten Losartan, aber auch in stärkerem Maße sein aktiver Metabolit EXP 3174 nach Applikation der Muttersubstanz ihre Stellung in der Therapie der Hypertonie manifestieren. Durch Einsatz von AT₁-Rezeptorantagonisten wurde der proliferative Faktor von Angiotensin II, Endothelin und Catecholaminen, der verantwortlich ist für eine vaskuläre und myokardiale Hypertrophie, unabhängig von der blutdrucksenkenden Wirkung ausgeschaltet.

Die kardiovaskuläre Homöostase wird nicht allein durch das zirkulierende RAAS reguliert, sondern auch durch das lokale RAAS, das Angiotensin II direkt in den verschiedenen Geweben (z.B. in Blutgefäßen, in der Niere und im Herz) synthetisiert. Folglich ist für eine lokale Angiotensin-II-Blockade z.B. auch die Penetration und Verteilung von spezifischen Antagonisten in diesen Geweben entscheidend für den Gesamteffekt, den diese aktiven Verbindungen auf den pharmakologischen Rezeptor ausüben.

1.1.3. Pharmakokinetik

Nach peroraler Applikation wird Losartan gut und nahrungsunabhängig resorbiert. Die Substanz unterliegt einem ausgeprägten First-pass-Metabolismus, der zur Bildung eines aktiven Metaboliten, der Carbonsäure EXP 3174, und weiteren inaktiven Metaboliten führt.

Die Charakterisierung der Proteinbindung von neuen Arzneistoffen ist ein wichtiger Aspekt zur Bestimmung der Verteilung, denn nur der freie ungebundene Anteil der Substanz kann in Wechselwirkung mit dem Rezeptor treten. In klinisch relevanten Konzentrationen sind Losartan und EXP 3174 im Humanplasma stark an Proteine, hauptsächlich Albumin, gebunden, wobei die Carbonsäure EXP 3174 (99,8%) höhere Affinität besitzt als die Muttersubstanz Losartan (98,7%). Die Proteinbindung von Losartan ist speziesabhängig und z.B. in Ratten höher als in Hunden. Für den aktiven Metaboliten EXP 3174 konnten in Bezug auf die Proteinbindung keine Speziesunterschiede zwischen Ratte und Mensch nachgewiesen werden (Christ 1995). Durch Gabe von pharmakologisch relevanten Dosen an Antiinflammatorika sowie anderen Arzneistoffen mit einer sehr hohen Proteinbindung (Warfarin, Diazepam) wurde die Plasmaproteinbindung beider Substanzen nicht verändert (Christ 1995). Aufgrund der sehr hohen Plasmaproteinbindung, die im therapeutischen Bereich nicht konzentrationsabhängig ist, sind weder Losartan noch EXP 3174 durch Hämodialyse aus dem Körper zu entfernen.

Etwa 14% (8% präsystemisch, 6% systemisch) von intravenös bzw. peroral appliziertem Losartan werden beim Menschen durch hepatische Oxidation zu dem aktiven Metaboliten biotransformiert, der für die lange Wirkdauer verantwortlich gemacht wird (Lo 1995). Es werden aber bedeutend höhere Plasmakonzentrationen von EXP 3174 mit einer annähernd 5-fachen $AUC_{0-\infty}$ im Vergleich mit Losartan beobachtet (Ohtawa 1993). Dies kann u.a. mit dem Befund erklärt werden, dass die Plasmaclearance von Losartan ($\approx 7,2$ ml/min/kg) annähernd 10-fach höher ist als die Clearance von EXP 3174 ($\approx 0,6$ ml/min/kg) (Lo 1995). Nach oraler Gabe sind die Plasmakonzentrations-Zeit-Profile von Losartan und auch von seinem aktiven Metaboliten durch polyexponentielle Funktionen mit terminalen Halbwertszeiten von 2 Stunden bzw. 6-9 Stunden zu beschreiben.

Die p.o.-Bioverfügbarkeit von Losartan beträgt bei Ratte und Mensch 33-36% (Wong 1990 (3)). Nach oraler Gabe von Losartan werden Maximalkonzentrationen nach ungefähr einer Stunde erreicht. Die Konzentrationsabnahme im terminalen Teil der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve erfolgt mit einer mittleren Halbwertszeit von 1,7-2,1 Stunden. Der Metabolit EXP 3174 erreicht nach 3-4 Stunden den maximalen Plasmaspiegel. Die mittlere terminale Halbwertszeit beträgt 4-6 Stunden.

Aus In-vivo-Studien von Lo (1995) und Ohtawa (1993) geht hervor, dass die pharmakokinetischen Parameter sich zwischen gesunden europäischen und japanischen Probanden unterscheiden. Der aktive Carbonsäuremetabolit EXP 3174 zeigte aber in beiden Populationen längere Eliminationshalbwertszeiten als die Muttersubstanz Losartan (Tabelle 1).

Weniger als 5 Prozent einer oralen Losartandosis werden unverändert mit dem Urin ausgeschieden. Die Ausscheidung von Losartan und EXP 3174 erfolgt beim Menschen zu 58% biliär und zu 35% renal. Innerhalb des therapeutischen Dosisbereichs (25-100 mg) wurde nicht nur ein lineares Verhältnis zwischen peroraler Losartandosis und Plasmakonzentration von Losartan und EXP 3174 gezeigt, sondern auch eine fehlende Akkumulation nach chronischer peroraler Losartangabe festgestellt.

Tabelle 1: Übersicht der mittleren pharmakokinetischen Parameter von Losartan und dem aktiven Metaboliten EXP 3174 nach peroraler Einmalapplikation von 50 mg Losartan in gesunden europäischen und japanischen Probanden (nach Lo 1995, Ohtawa 1993)

	Losartan		EXP 3174	
	Europäer	Japaner	Europäer	Japaner
C_{max} [µg/l]	0,29	0,19	0,25	0,46
t_{max} [h]	1,0	1,3	4,1	3,0
AUC_{0-∞} [µl/l·h]	0,48	0,35	1,9	2,65
t_{1/2} [h]	2,1	1,7	6,4	3,75
Ae [% der Dosis]	4,2	3,2	6,1	6,9
CL_{ren} [l/h]	4,3	5,6	1,6	1,5

Klinisch relevante Effekte einer Nierenfunktionsstörung auf die pharmakokinetischen Parameter konnten für Losartan nicht nachgewiesen werden (Sica 1995), demzufolge ist bei dieser Patientengruppe keine Dosisanpassung notwendig. Bei Patienten mit leichter bis mittelschwerer alkoholischer Leberzirrhose sind hingegen die Plasmakonzentrationen von Losartan und seinem aktiven Metaboliten um das 5-fache (Losartan) bzw. 1,7-fache (EXP 3174) erhöht, die Bioverfügbarkeit verdoppelt und die totale Plasmaclearance um 50% vermindert, so dass eine Anpassung der applizierten Dosis erforderlich ist (Merck 1995).

1.1.4. Einfluss intestinaler Transporter auf die Absorption von Losartan

Verschiedene physikalische Parameter, wie z.B. die Molekülgröße und -gestalt, Lipophilie, Wasserstoffbindungskapazität sowie die Eigenschaften der Moleküloberfläche scheinen eine entscheidende Rolle in der Absorption von Arzneistoffen zu spielen, die das intestinale Epithel über passive Diffusionsprozesse, transzelluläre oder parazelluläre Vorgänge passieren (Boisset 2000, Palm 1996). Lipinski (1997) verdeutlichte in seiner Arbeit zum Einfluss physikochemischer Parameter auf die Absorption, deren Hauptergebnisse er als "Rule of 5" zusammenfasste, dass eine geringe Absorption bzw. Permeation wahrscheinlich ist, wenn die Substanzen ein Molekulargewicht von mehr als 500 Da besitzen, der ermittelte log D-Wert (clog D) größer als 5 ist und mehr als 5 H-gebundene Donatoren ("H-bond donors", Summe von OH und NH) bzw. mehr als 2·5 H-gebundene Akzeptoren ("H-bond acceptors", Summe von O und N) im Molekül vorhanden sind (Lipinski 1997).

Verschiedene Modellsysteme (Caco-2-Monolayer, Ussing-Kammer, Darmperfusionsstudien) wurden entwickelt, um die Beziehung zwischen diesen Parametern und der Arzneistoffabsorption abschätzen zu können (z.B. Boisset 2000, Ungell 1997, Rubas 1996).

Aus der geringen und zudem auch variablen Bioverfügbarkeit des Losartans (Lo 1995) schloss man, dass zusätzlich zu dem ausgeprägten First-pass-Effekt auch noch ein intestinales Countertransportsystem als signifikanter bioverfügbarkeitsbestimmender Faktor eine Rolle spielen könnte (Spahn-Langguth 1998). Ribadeneira (1996) fand, dass für die intestinale Permeabilität von Losartan und EXP 3174 der Substituent in Position 5 des Imidazolringes ausschlaggebend ist, was darin verdeutlicht wird, dass die Verbindung mit einer Alkoholgruppe (Losartan) eine höhere intestinale Permeabilität aufweist als EXP 3174 mit einer Säuregruppe in dieser Position.

1.2. Das intestinale Epithel als Absorptionsbarriere

Lange Zeit wurde das intestinale Epithel als eine Kombination von verschiedenen separaten, passiven Barrieren in der Arzneistoffabsorption angesehen. Die Erkenntnis, dass diese Barrierefunktion selektiv sein kann, führte zur Untersuchung der Mechanismen, die die Absorption erleichtern bzw. verhindern. Die Annahme der teilweise selektiven Natur der intestinalen Barriere lag darin begründet, dass das intestinale Epithel eine erleichterte Absorption von Nährstoffen und Nahrungsbestandteilen, wie z.B. von Zuckern,

Aminosäuren, kleinen Peptiden, Nukleosiden, Vitaminen und Spurenelementen erlaubt, wobei auch die Aufnahme von anderen physiologisch relevanten Substanzen, die sich im Darmlumen befinden (z.B. Gallensäuren), erleichtert ist.

Spezifische Transportsysteme, die in den luminalen (apikal) und basolateralen Membrandomänen der Enterozyten lokalisiert sind (Simons 1985), sind verantwortlich für die erleichterte Absorption von essentiellen Nahrungsbestandteilen. Gene, die die Entcodierung dieser Transportsysteme ermöglichen, wurden schnell identifiziert und trugen zum Verständnis der Funktionsweise der Transporter bei. Dabei stellte sich aber auch heraus, dass die Substratspezifität sehr breit sein kann und eine Erkennung von Substanzen erlaubt, die keine Nahrungsbestandteile sind.

In der intestinalen Mukosa sind angrenzende Epithelzellen durch interzelluläre tight junctions miteinander verbunden, die früher als statische Strukturen betrachtet wurden (Bjarnson 1995). Mittlerweile erforderte aber die Entdeckung der dynamischen Natur der tight junctions, diese als wichtigen Mechanismus bei der Absorption von bestimmten hydrophilen Stoffen durch Modulation der junctionalen Permeabilität (Collares-Buzato 1994) zu akzeptieren.

Man weiß heute, dass der First-pass-Effekt nach oraler Applikation von Arzneistoffen in der Leber am größten ist, aber auch die Enterozyten des Darmes eine signifikante Rolle bei metabolischen und sekretorischen Prozessen spielen. Ebenso spielt die nicht-biliäre, also die intestinale Ausscheidung eine signifikante Rolle in der präsystemischen Arzneistoffelimination. Die entsprechenden sekretorischen Effluxsysteme sind auch in der Leber und der Niere lokalisiert (Hunter 1997).

Der ökonomischste und einfachste Weg, dem Organismus einen Arzneistoff zu verabreichen, ist die enterale (perorale) Route mit dem Intestinaltrakt als Hauptort für Absorptionsprozesse bedingt durch die Spezialisierung der Mukosazellen und die lange Transitzeit durch den Gastrointestinaltrakt (GIT) (Kararli 1989). Die Bioverfügbarkeit peroral applizierter Arzneistoffe kann durch drei Hauptfaktoren limitiert werden:

- ⇒ Absorptionsmangel aus dem Darmlumen,
- ⇒ First-pass-Metabolismus durch Enzyme der Darmwand und
- ⇒ First-pass-Effekt durch Metabolismus und Transport in der Leber (Ito 1998).

Nicht alle Arzneistoffe und Formulierungen weisen eine zufriedenstellende Absorptionskinetik aus dem GIT auf (Utkovic 1999). Faktoren, die für eine mangelnde Substanzabsorption verantwortlich sind, werden durch die physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffes, die Spezifität für intestinale Transportsysteme sowie durch anatomisch/morphologisch/physiologische Eigenschaften des GIT (Gan 1997, Ungell 1997) hervorgerufen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Faktoren, die die Resorption und Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen beeinflussen können (nach Grass 1997, Ungell 1997)

Physikalische Parameter	Physiologische Parameter
Löslichkeit, Auflöserate	Motorik und Transitzeit im Magen-Darm-Trakt
Wasserstoffbrückenbindungen	Metabolismus (Darmlumen, -wand, Leber)
Größe der polaren Oberfläche	Nahrungseinfluss, -zusammensetzung, Komplexbildung
Molekül- und Partikelgröße	Regionaler pH-Wert (Lumen; Oberfläche der Mukosa)
Chemische Stabilität, Kristallform	Oberfläche, Mukusbildung, Enzyme, Bakterien
Lipophilie, pK _a , Verteilungskoeffizient	Blutfluss, Wasserfluss, biliäre Exkretion, Leberaufnahme
	Pharmakologische Effekte, Erkrankungen
	Membranpermeabilität, intestinale Sekretion

Die physikalischen Parameter werden hauptsächlich von den physikochemischen Eigenschaften der Substanz bestimmt. Die ersten beiden Parameter stehen in einer Wechselbeziehung und beeinflussen die Eigenschaft der Substanz, sich ausreichend schnell zu lösen, damit im entsprechenden Zeitfenster eine Absorption möglich ist, da diese sonst mit dem Stuhl ausgeschieden wird (Aungst 1993). Die Molekülgröße und der Verteilungskoeffizient bestimmen die Interaktion der Substanz mit dem intestinalen Gewebe, insbesondere, wenn die Substanz parazellulär oder transzellulär absorbiert wird.

Das Milieu des Darminhaltes, einschließlich Nahrungseinflüsse, kann durch die Möglichkeit der Komplexbildung und Substanzbindung dazu führen, dass geringere Arzneistoffmengen absorbiert werden. Regionale pH-Wertunterschiede können die Auflösung verhindern, eine Ausfällung hervorrufen oder aber eine Umgebung schaffen, die zu einer Instabilität des Stoffes führt. Penicilline, Omeprazol und Peptide sind Substanzen, die im sauren pH-Wert des Magens instabil sind (Aungst 1993). Dem First-pass-Metabolismus wird nahezu ausschließlich ein hepatischer Charakter zugeschrieben, obwohl in zunehmendem Maß erkannt wird, dass sowohl metabolische Veränderungen im Darmgewebe als auch präabsorptive metabolische Veränderungen durch luminale Enzyme (z.B. Hydrolasen) oder Mikroorganismen während der Absorption stattfinden können (Hunter 1997). Schwankungen in der Magenentleerungszeit und der gastrointestinalen Transit-Zeit führen ggf. ebenfalls zu signifikanten Veränderungen der Bioverfügbarkeit, da die Kontaktzeit der Substanz mit dem bevorzugten Absorptionsbereich verändert sein kann und die intestinale Permeabilität (als Maß für die Möglichkeit einer Substanz, die erste intestinale Barriere zu überwinden) variiert.

Die Absorption einer Substanz wird zum größten Teil durch die chemische Struktur des Moleküls bestimmt, wobei im Normalfall der Absorption vor allem passive Diffusionsprozesse aus dem GIT zugrunde liegen. Lipophile Stoffe überwinden dabei generell schneller die intestinale Membran als hydrophilere, da sie aufgrund ihrer hohen Lipophilie leicht in die Lipidlayer der Membran permeieren und so über die Epithelzellen absorbiert werden. Hydrophile Arzneistoffe und Peptide hingegen können die Wand des GIT durch die tight junctions bzw. den Interzellularraum passieren, ein Weg, der nur für sehr kleine hydrophile Stoffe relevant ist.

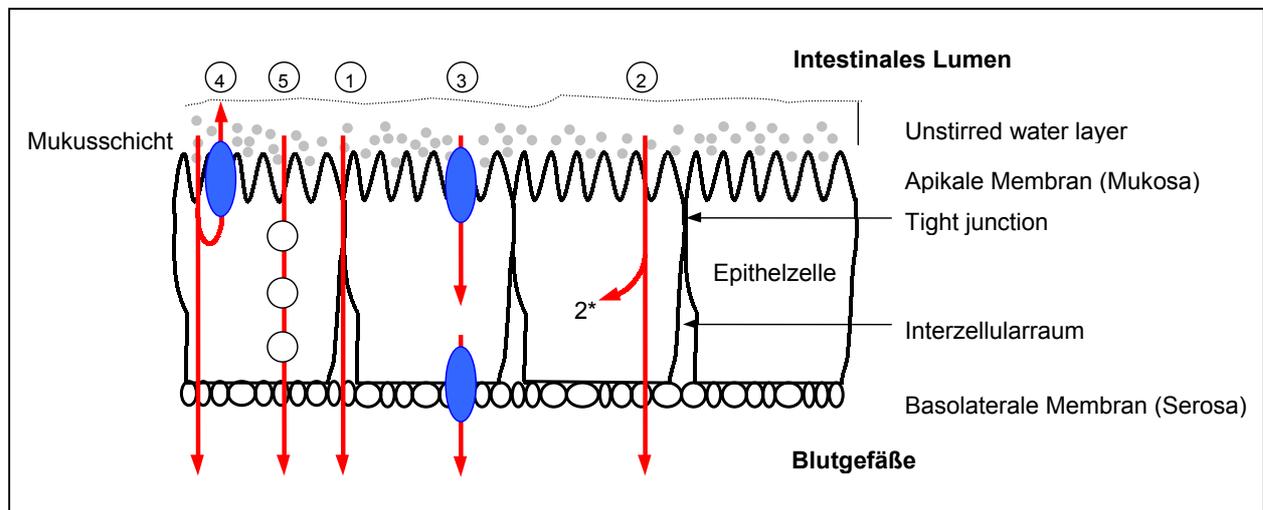


Abbildung 5: Schematische Darstellung des intestinalen Epithels sowie der Transportmechanismen durch die Absorptionsbarriere: 1 Parazelluläre Diffusion durch tight junctions

2 Transzelluläre passive Diffusion (2* intrazellulärer Metabolismus)

3 Carrier-vermittelter transzellulärer Transport

4 Transzelluläre Diffusion modifiziert durch einen apikal polarisierten Effluxmechanismus

5 Transzelluläre vesikuläre Transzytose

Eine geringe Membranpermeabilität ist ebenfalls ein limitierender Faktor für die Bioverfügbarkeit. Zur Überwindung des intestinalen Epithels existieren zwei Hauptrouten: der transzelluläre und der parazelluläre Weg (Abbildung 5).

Unter dem parazellulären Weg versteht man den Transport zwischen angrenzenden Enterozyten durch

- ⇒ passive Diffusion und/oder
- ⇒ konvektiven Flüssigkeitsstrom.

Der transzelluläre Weg schließt

- ⇒ die passive Diffusion von Molekülen durch die Epithelzellen,
- ⇒ die erleichterte Diffusion,
- ⇒ den Carrier-vermittelten Transport und
- ⇒ die Rezeptor-vermittelte Transzytose ein.

1.2.1. Parazellulärer Transport

Da aneinander grenzende Epithelzellen durch Proteinkomplexe, die tight junctions genannt werden, miteinander verbunden sind, können Arzneistoffmoleküle zwischen Zellen nur durch passive Diffusion und/oder durch den konvektiven Flüssigkeitsstrom transportiert werden. Die tight junctions bestehen aus 5 Untereinheiten und fungieren, durch Aktin assoziiert, als Größen- und Ladungsbarriere (Madara 1994). Erhöhte Konzentrationen von negativen Ladungen in den tight junctions ermöglichen eher Kationen als Anionen diesen Transportweg. Der parazelluläre Transportweg ist quantitativ unbedeutend für die Absorption von Arzneistoffen mit Molekulargewichten über 200, da die Porengröße der tight junctions beim Menschen 4-8 Å und bei der Ratte 10-15 Å beträgt (Lennernäs 1995).

1.2.2. Transzellulärer Transport

Der transzelluläre Transport eines Moleküls ist sowohl durch passive Mechanismen als auch durch spezifische Carriersysteme möglich.

1.2.2.1. Passive transzelluläre Diffusion

Für die passive transzelluläre Diffusion, den häufigsten Mechanismus für die Absorption von lipophileren Substanzen aus dem GIT, müssen die Moleküle spezielle physikochemische Eigenschaften (Größe, Ladung, Lipophilie, Wasserstoffbindungskapazität) aufweisen, um die beiden lipophilen Barrieren (apikale und basolaterale Membran) zu überwinden (Kararli 1989, Hillgren 1995).

Die beiden Membrandomänen (apikal, basolateral) werden durch das wässrige Zytoplasma voneinander getrennt, so dass ein erleichterter Transport durch dieses Kompartiment stattfindet, wenn die Substanzen an zytoplasmatische Komponenten gebunden sind. Es wird aber auch angenommen, dass Arzneistoffmoleküle in der Lage sind, durch die Membran zur basolateralen Seite zu diffundieren, ohne ins Zytosol einzutreten (Burton 1991).

Die Moleküle werden in die Lipidmembran eingelagert, diffundieren über die apikale Membran in das Zytosol und werden auf die gleiche Weise durch Passage der basolateralen Membran aus der Zelle ausgeschleust. Der Transport durch die apikale Membran gilt generell als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, da die basolaterale Membran einen geringeren Widerstand zeigt als die apikale Membran (Lande 1994).

Substanzen, die über passive transzelluläre Absorptionsmechanismen aufgenommen werden, können aber auch Substrate für den intrazellulären Metabolismus in den Enterozyten sein. Auch eine Affinität zu apikal polarisierten Effluxmechanismen (z.B. P-GP, OCT, MRP) kann von Bedeutung sein (Hunter 1991, 1993).

1.2.2.2. Transzelluläre vesikuläre Transzytose/Endozytose

Die rezeptorvermittelten Transportmechanismen von Substanzen leisten keinen signifikanten Beitrag für die Arzneistoffabsorption aus dem Darmlumen, ermöglichen jedoch die Aufnahme in (Endozytose) und den Transport durch die Zellen (Transzytose). Dieser Prozess wird initiiert durch Ligand/Rezeptorinteraktionen in der apikalen Membran, die zur Folge haben, dass ein Teil der Membran

in Form von Vesikeln in die Zelle aufgenommen wird und so an verschiedene Stellen der Zelle gelangen kann. Der Mechanismus, der den Weg der Vesikel durch die Zelle bestimmt, ist unklar (Swaan 1998).

Der transzytotische Weg ist hauptsächlich für die Freisetzung von Antigenen aus spezialisierten intestinalen M-Zellen (im follikel-assoziierten Epithel, das über dem Lymphgewebe des Darmes liegt, lokalisiert) von Bedeutung und für die Freisetzung von Makromolekülen, wenn ein Targeting zum mukosalen Immunsystem das Ziel ist (Hunter 1997).

1.2.2.3. Carrier-vermittelter Transport

Die erleichterte Diffusion ist die einfachste Form des Carrier-vermittelten Transportes. Carrier werden zum Transport von polaren, hydrophilen Substraten, wie z.B. Nährstoffen, Vitaminen und Gallensalzen benötigt (Kim 1993), sind aber auch von Bedeutung für spezifische Klassen von Arzneistoffen.

Dieser Transport wird durch integrale Membranproteine ermöglicht, die drei Konformationsstadien annehmen können. Zwei dieser Stadien sind von Bedeutung für die Ligandenbindung an der inneren oder äußeren Zellseite. Die Bindung der Substanzen an den Carrier an der Membranoberfläche ist abhängig von der Substratkonzentration, aber auch von der Affinität des Substrates zum Protein. Die Transportrichtung wird vom Stoffgradienten bestimmt und die Transportgeschwindigkeit von der Dichte der Carrier in der Membran. Bei der erleichterten Diffusion wird keine Energiequelle wie ATP gebraucht, da der Transport nicht gegen den Konzentrationsgradienten erfolgt (Delahunty 1987).

Der Carrier-vermittelte Transport ist durch verschiedene Substratspezifitäten und Transportkapazitäten charakterisiert und kann gesättigt werden, wenn die luminale Konzentration zu hoch ist. Daraus würden eine Abnahme der absorbierten Arzneistoffmenge und eine geringere Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes resultieren.

Die Darmmukosa enthält eine Vielzahl von Carriern, die verantwortlich sind für die Absorption von verschiedenen Nahrungsbestandteilen, wie z.B. Aminosäuren, Monosacchariden (D-Glucose), Di/Tripeptiden, Fettsäuren und verschiedenen wasserlöslichen Vitaminen (Madara 1994, Tamai 1996, Tsuji 1996). Hydrophile Arzneistoffe mit ähnlicher chemischer Struktur wie die vom Carrier transportierten Nahrungsbestandteile können ebenfalls mittels dieser Carriersysteme transportiert werden. L-Dopa (Hu 1990) und D-Cycloserin (Thwaites 1995) z.B. werden durch den intestinalen Aminosäuretransporter absorbiert, während verschiedene oral verfügbare Cephalosporine (Inui 1992), ACE-Inhibitoren und Reninantagonisten Substrate für den intestinalen Oligopeptidtransporter (PepT1) (Saitoh 1995, Hidalgo 1995) darstellen.

Die Na^+/K^+ -ATPase in der basolateralen Membran sowie der Na^+/H^+ -Transporter in der apikalen Membran halten nach innen gerichtete Na^+ - und H^+ -Gradienten durch die apikale Membran aufrecht, die entscheidend sind für die Effektivität des Carrier-vermittelten Transportes (Tsuji 1996).

Epithelzellen verschiedener Organe, z.B. aus Niere und Darm, besitzen in ihren apikalen und basolateralen Membranen eine Vielzahl von Transportsystemen, die ein- oder auswärtsgerichtete Substrattranslokationen katalysieren und demzufolge entweder aktive Aufnahmesysteme oder sekretorische Mechanismen darstellen.

1.2.3 Transporter – Allgemeine Aspekte und Charakterisierung ausgewählter Transportsysteme

Der Carrier-vermittelte Transport ist besonders bedeutend für Moleküle, die nicht anderweitig die biologischen Membranen überwinden können, speziell bei limitierter Größe, Ladung und Polarität. Die Leber, Niere und der Darm beinhalten die meisten verantwortlichen Transporter für die Carrier-vermittelte Arzneistoffelimination. Zusätzlich zu den Absorptions- und Eliminationsprozessen besitzen Membrantransporter eine bedeutende Funktion in der Organverteilung und Absorption von verschiedenen Arzneistoffen.

Nach dem menschlichen Genom-Projekt (human genome project) wird die Anzahl von menschlichen protein-entcodierenden Transkripten auf 30000 geschätzt (Venter 2001). Davon sollen 533 Transporter für anorganische und organische Substanzen darstellen.

Die meisten Transporter sind organisiert in einer von zwei Superfamilien, der "solute carrier (SLC)"-Familie und der "ATP-binding cassette (ABC)"-Familie. Zur Zeit sind 212 Gene identifiziert, die Familienmitglieder der SLC-Familie sind. In Tabelle 3 sind die Familien der bekanntesten Mitglieder der SLC-Superfamilie zusammen mit einer Auswahl der vermuteten Liganden dargestellt. Interessanterweise sind nur drei aus insgesamt 32 Familien intrazelluläre Transporter, die große Mehrheit ist auf der Plasmamembran der Zellen lokalisiert. Von diesen wird wiederum nur eine Untergruppe der Transporterfamilien mit dem Transport von Arzneistoffmolekülen in Verbindung gebracht. Die Terminologie dieser Transporter ist teilweise kompliziert (Tabelle 3). Beispielsweise schließen Mitglieder der SLC-Carrierfamilie in der Unterfamilie 22 die organischen Kationentransporter (OCT1-OCT3 und OCTN1 und OCTN2), aber auch die organischen Anionentransporter (OAT1-OAT3) ein. Mitglieder dieser Transporterfamilie differenzieren zwischen positiv und negativ geladenen Arzneistoffmolekülen.

Tabelle 3: Familie der SLC-Transporter (solute carrier family): Kurzübersicht ausgewählter Subfamilien und deren Liganden

Symbol der Unterfamilie (Beispiele)	Anzahl der Transporter (Mitglieder)	Name	Liganden
3	A1, A2	Aminosäuretransporter (neutral)	L-Dopa
7	A1 – A11	Aminosäuretransporter (kationisch)	
10	A1, A2	Na ⁺ /Gallensäure-Cotransporter	
15	A1, A2	Oligopeptid- und H ⁺ /Peptidtransporter	β-Lactamantibiotika, ACE-Hemmer
16	A1 – A10	Monocarbonsäuretransporter (MCT)	Benzoe-, Milchsäure, Fettsäuren (kurzkettig)
21	A1 – A14	Organischer Anionentransporter (OAT)	Fexofenadin, Prostaglandine, β-Lactamantibiotika,
22	A1 – A11, A1L, A1LS	Organischer Anionen- und Kationentransporter (OCT)	Penicilline, Verapamil, Chinidin, Dopamin, Tetraethylammonium

Die zweite Transporterfamilie, die ABC-Familie, fasst 48 Transportergene zusammen (Tabelle 4). Der Terminus ABC (ATP-binding cassette) beinhaltet, dass alle Mitglieder der ABC-Familie primär aktive Transporter sind und Energie für den direkten Transport des Substrates durch ATP-Hydrolyse geliefert wird. Der "aktive Transport" ist generell charakterisiert durch einen Verbrauch von Energie, durch Substratspezifität, durch eine bevorzugte Transportrichtung, Sättigbarkeit und kompetitive Hemmung durch gleichzeitig transportierte Moleküle. Der Begriff "erleichterte Diffusion" andererseits beschreibt einen Prozess, in dem der Carrier-vermittelte Transport nicht gleichzeitig an einen energiebereitstellenden Prozess gebunden ist (SLC-Transporter). Die treibende Kraft ist vielmehr ein elektrochemischer Gradient entlang der Membran (sekundärer aktiver Transport), der z.B. durch eine ungleiche Verteilung von positiv und negativ geladenen Ionen (Na⁺, H⁺, HCO₃⁻, Cl⁻) entlang der Membran aufgebaut wird.

Carrier-vermittelte Absorptions-, Verteilungs- und Eliminationsprozesse sind seit langer Zeit bekannt, so dass die Substrate für eine Carrier-vermittelte Absorption z.T. schon seit langem bekannt sind (D-Glucose, L-Dopa, Eisen, Ascorbinsäure, kleine Peptide, Cephalosporine, ACE-Hemmer).

Wichtige Barrieren für Xenobiotika sind z.B. die Blut-Hirn-Schranke und die Plazentaschranke, die beide eine Vielzahl von Transportsystemen enthalten, um bestimmte Verbindungen selektiv aufzunehmen, andere dagegen aus dem entsprechenden Organ fernzuhalten.

Es wurden auch Transporter (SLC16) für Monocarboxylate (MCT1-MCT7) und Dicarboxylate gefunden. Die Carrier-vermittelte Elimination in der Leber und/oder Niere und/oder im Darm wurde z.B. für p-Aminohippursäure, Penicilline, Cephalosporine, quartäre Ammoniumverbindungen, Digoxin, Ciprofloxacin und Vincristin beschrieben.

Vergleichsweise neu ist das Wissen über Carrier-vermittelte anti-absorptive Transporter im Darm. In vivo ist es ggf. schwierig, zwischen intestinaler Exsorption und Metabolismus zu unterscheiden, da beide

Vorgänge die Substanzmenge reduzieren, die in den portalen Blutkreislauf eintritt und dosisabhängig zu einer geringeren Bioverfügbarkeit bei niedriger Dosierung und zu einer höheren Bioverfügbarkeit bei höherer Dosierung führt. Eine Differenzierung in In-vivo-Studien ist nur bei selektiver Hemmung mit Prozess-spezifischen Inhibitoren möglich (Wu 1995, Spahn-Langguth 1998).

Intestinale exsorptive Transporter zeigen vor allem dann ihre Relevanz, wenn hochspezifische, potente, insbesondere niedrigdosierte Arzneistoffe entwickelt werden.

Tabelle 4: Familie der ABC-Transporter (ATP-binding cassette family): Kurzübersicht der Subfamilien und deren Liganden

Symbol der Unterfamilie	Anzahl der Transporter (Mitglieder)	Name	Liganden
A	A1 - A12	ABC1	Estramustin, Lipide
B	B1 - B11 z.B. B1	MDR/TAP MDR1, P-GP	Steroide, hydrophobe basische Substanzen
C	C1 - C12 z.B. C1 z.B. C2	CFTR/MRP MRP1 MRP2/cMOAT	Anion. Konjugate z.B. mit Glutathion, Sulfat, Gallensäuren
D	D1 - D4	ALD	Fettsäuren (langkettig)
E	E1	OABP	
F	F1 - F3	GCN20	
G	G1 - G5, G8	WHITE	Chemotherapeutika

1.2.3.1. Monocarbonsäuretransporter (MCT)

Monocarbonsäuren, wie z.B. die Milchsäure als Endprodukt der Glykolyse, spielen eine zentrale Rolle im Metabolismus aller Zellen, sind aber auch entscheidend für die metabolische Kommunikation zwischen den Zellen der Gewebe (Poole 1993). Essentiell für diese Schlüsselrolle ist der schnelle Transport durch die Plasmamembran, der durch die Familie der protonengekoppelten Monocarbonsäuretransporter (MCT1-4) katalysiert wird (Takanaga 1994, Tsuji 1994), da geladene Moleküle die Plasmamembran nicht mittels freier Diffusion überwinden können. Der Monocarbonsäuretransporter (Abbildung 6) katalysiert die erleichterte Diffusion von Laktat in Gegenwart eines Protons, ohne Zufuhr von Energie. Die treibende Kraft für die Akkumulation oder Exklusion von Laktat stellt der Konzentrationsgradient von Laktat und Protonen, in Form eines pH-Gradienten dar (Poole 1993, Juel 1997).

Obwohl der Laktattransport durch die Plasmamembran quantitativ am höchsten ist, können mit Hilfe des MCT auch andere metabolisch bedeutende Monocarbonsäuren (Brenztraubensäure, Essigsäure, Hydroxybuttersäure) die Membran passieren. Für einige Substrate des MCT1 (Laktat, Mandelsäure) konnte eine Stereospezifität nachgewiesen werden, die sich in höheren Permeabilitäten des L-Isomers äußerte (Halestrap 1999).

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Netto-Milchsäurefluxes zur Vollendung des Transportzyklus ist das "Zurücksenden" des freien Carriers durch die Membran. Sinkende pH-Werte auf der laktathaltigen Seite bzw. erhöhte pH-Werte auf der Gegenseite führen zu einer Transportstimulation und Permeabilitätssteigerung (Halestrap 1999, Tamai 1999).

MCT's (MCT1, 2 und 3), bestehend aus 12 transmembranären Helices, wurden aus dem Menschen, der Ratte und der Maus kloniert, wobei der MCT1 auf dem Chromosom 1 (Garcia 1994), der MCT2 auf dem Chromosom 12 (Gerhart 1998) und der MCT3 auf dem Chromosom 22 lokalisiert ist. Innerhalb der Subtypen konnte zwischen MCT1 und MCT2 eine 60%-ige Homologie nachgewiesen werden (Halestrap 1999), für den MCT3 wurde eine Homologie von 43% und 45% zum MCT1 und MCT2 nachgewiesen (Yoon 1997).

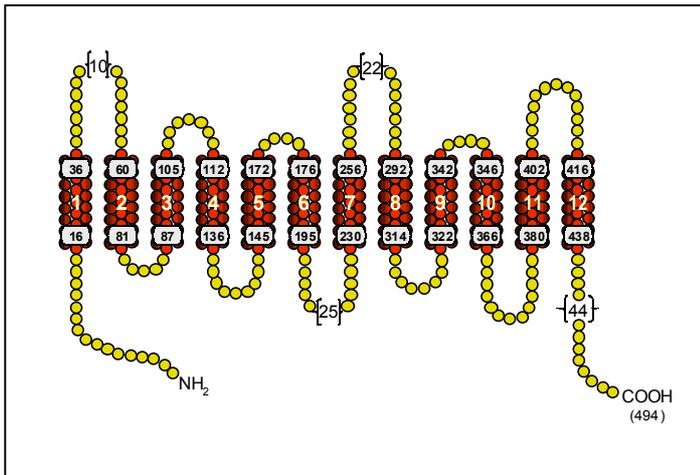


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Monocarbonsäuretransporters MCT1 (nach Tsuji 1996)

Der N-terminale Teil des Transporters ist bedeutend für energetische Kopplungsvorgänge (Na^+ oder H^+), Membraneinbau und/oder die korrekte Strukturaufrechterhaltung, während der C-terminale Teil der Domäne bedeutend für die Bestimmung der Substratspezifität ist (Saier 1994). Sequenzanalysen ergaben für den MCT3 eine mögliche Glykosylierungsstelle, für MCT1 und MCT2 hingegen konnten keine Glykosylierungsstellen nachgewiesen werden (Halestrap 1999).

Für die physiologischen Hauptsubstrate (Pyruvat, Laktat und Ketonkörper) konnten für MCT1 und MCT2 ähnliche Affinitäten nachgewiesen werden (Jackson 1996).

Für die Isoformen des Monocarbonsäuretransporters wurde eine unterschiedliche Gewebeverteilung detektiert.

MCT1 wird hauptsächlich im Herz und in den roten Muskelzellen gebildet, konnte aber auch in der luminalen und abluminalen Membran der Hirnkapillaren bestimmt werden (Kido 2000, Gerhart 1997).

Anhand immunohistochemischer Untersuchungen wurde eine Verteilung des MCT1 innerhalb des gesamten GIT bestätigt und gleichzeitig nachgewiesen, dass der MCT1 im intestinalen Gewebe eine höhere Intensität in der basolateralen Membran hat als in der apikalen, dass MCT1-Protein jedoch auch in der Brush-Border-Membran zu finden ist (Tamai 1999).

Der MCT2 besitzt eine 10-fach höhere Affinität für Substrate als MCT1 und MCT4 und wurde hauptsächlich in der Leber, in Zellen des proximalen Nierentubulus und Neuronen gefunden.

Der MCT3 wurde bisher nur im Retinapigmentepithel nachgewiesen, wo er an der basolateralen Membran lokalisiert ist (Philp 1995, 1998).

Die Expression des MCT4, dessen Gen auf dem Chromosom 17 lokalisiert ist (Halestrap 1999), wurde meist in weißen Muskelzellen mit hoher glykolytischer Aktivität und Prädominanz des Laktatflusses (vergleichbar den Tumorzellen und Leukozyten) nachgewiesen.

Eine direkte Untersuchung des protonengekoppelten Laktat- und Pyruvattransportes wurde demonstriert für den MCT1-4, aber nur für den MCT1 und 2 sind detaillierte Analysen der Substrate und Inhibitorkinetiken beschrieben. Die Inhibitoren des MCT1 werden in 4 Kategorien (Substituierte aromatische Monocarbonsäuren, Hemmer des Anionentransportes, Flavonoide sowie Thiol- und Aminoreagenzien) eingeteilt, sind aber nicht spezifisch für MCT1 (Halestrap 1999).

1.2.3.2. Oligopeptidtransporter (PepT)

Der intestinale Oligopeptidtransporter PepT1 (Abbildung 7) und seine renale Isoform PepT2 vermitteln den protonengekoppelten Transport von Oligopeptiden aus dem Darmlumen in die Enterozyten bzw. aus dem glomerulären Filtrat in die Nierentubulusepithelzellen, um aus der extrazellulären Peptidhydrolyse Oligopeptide zur intrazellulären Bereitstellung von Stickstoff für die Proteinbiosynthese und die Konservierung von Stickstoffgruppen zu gewinnen (Daniel 1996). Sie werden daher zur Familie der protonenabhängigen Peptidtransporter (Ptr) gerechnet (Steiner 1995), die eine Untergruppe der Familie der Protonen-Oligopeptidtransporter (POT (Paulsen 1994)) darstellen. Die treibende Kraft des Substrattransports in die Zelle ist ein Protonengradient, der durch die Aktivität des Na^+/H^+ -Antiporters aufrecht erhalten wird (Temple 1995), wobei der apikale Einstrom der Na^+ -Ionen in die Tubulusepithelzellen und Enterozyten von der ATP-abhängigen Na^+/K^+ -ATPase in der basalen Membran kompensiert wird. Dadurch sind PepT2 und PepT1 als tertiär aktive Transportsysteme charakterisiert (Daniel 1997).

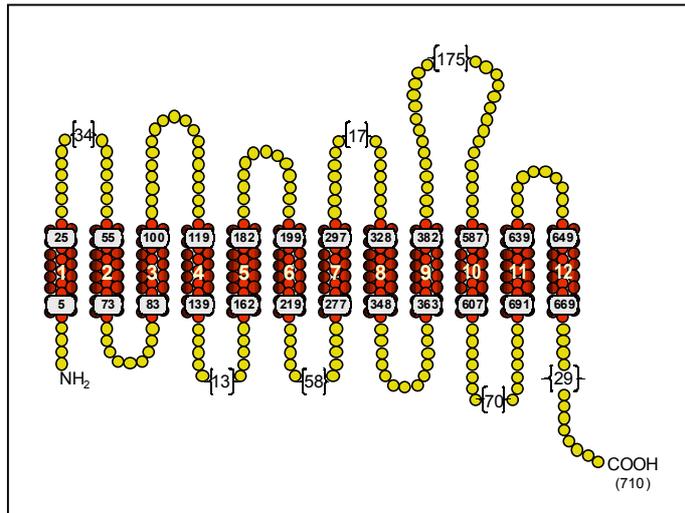


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Oligopeptidtransporters PepT1 (nach Tsuji 1996)

(Liang 1995) und Ratte (Saito 1995)). Durch Expressionsstudien von PepT1 in verschiedenen Zellsystemen (Caco-2 (Wenzel 1996, Terada 1999); LLC-PK1-Zellen (Terada 1997, Wenzel 1998)) konnte die Transportkinetik charakterisiert werden, wobei für PepT1 eine niedrigere Substrataffinität und eine höhere Transportkapazität im Gegensatz zum PepT2 gefunden wurde (Saito 1997). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass die vermehrte enterale Zufuhr von Peptiden eine von hormoneller oder neuronaler Kontrolle unabhängig gesteigerte Expression von PepT1 im Menschen zur Folge hat (Walker 1998).

Eine Verletzung der Darmmukosa beeinflusst den intestinalen Peptidtransport nur gering, was auf eine gesteigerte PepT1-Expression zurückgeführt wird (Tanaka 1998). Neben Oligopeptiden werden verschiedene Peptidpharmaka von PepT1 als Substrat erkannt.

1.2.3.3. Transporter der Multidrug-Resistenz

Die Multidrug-Resistenz von Tumorzellen kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden, wobei die Überexprimierung von MDR und MRP eine mögliche molekulare Basis darstellen. Beide Effluxtransportsysteme gehören, wie auch verschiedene andere bakterielle und eukaryotische Transporter, zu den ABC-Transportern (Cole 1992).

1.2.3.3.1. P-Glykoprotein (P-GP)

Das Plasmamembranprotein P-GP (Abbildung 8), ein transmembranäres Protein von 170 kDa (Tsuji 1996), wurde zuerst von Ling in Multidrug-resistenten Hamsterzellen charakterisiert (Kartner 1983) und vermittelt durch einen ATP-abhängigen Mechanismus den nach außen gerichteten Substanztransport. Die P-GP-Expression in Tumorzellen führt zu einer reduzierten Akkumulation von Chemotherapeutika im Zellinneren mit gleichzeitig zunehmendem Substanzefflux und damit bedingter abnehmender Zytotoxizität (Krishna 2000). Aufgrund der Lokalisation an der Absorptionsbarriere des GIT und der breiten Substratspezifität sollte das Auftreten von und die Wechselwirkung mit P-GP als Erklärungsmöglichkeit für schwankende Absorptionsprofile und limitierte Bioverfügbarkeit in Erwägung gezogen werden (Lown 1997).

Gensequenzanalysen zeigten, dass P-GP aus 2 gleichen Domänen besteht, die zusammen 1280 Aminosäuren enthalten und untereinander zu 43% homolog sind. Die Topologie der beiden hydrophoben transmembranären Domänen wurde durch hydrophatischen Plot vorhergesagt (Jones 2000) und zeigt, dass jede Domäne aus 6 transmembranären α -Helices besteht. Gleichzeitig konnten noch 3 extrazytoplasmatische Glykosylierungsstellen in der ersten Domäne nachgewiesen werden

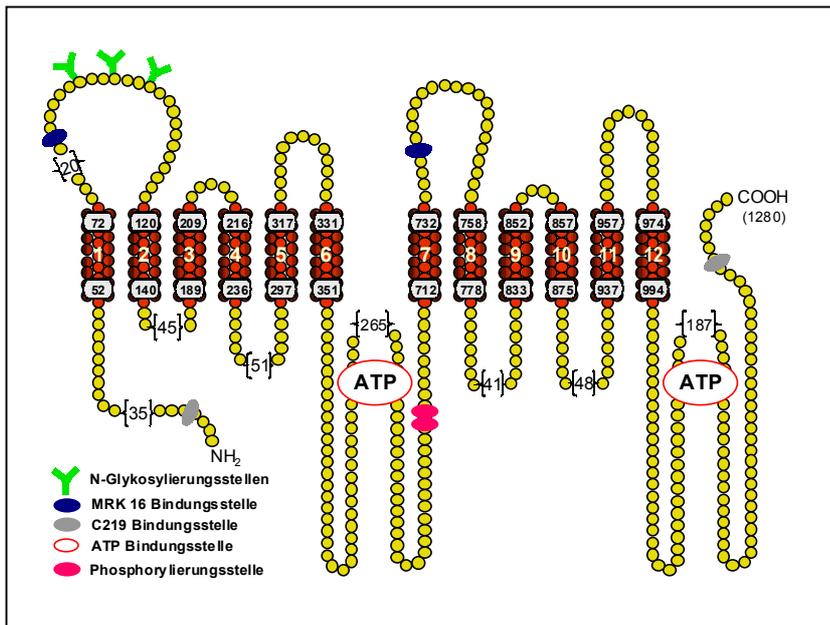
Neben den körpereigenen Di- und Tripeptiden konnten in den letzten Jahren eine Reihe von β -Laktamantibiotika wie z.B. Cefadroxil als Substrate für PepT2 (Inui 1984; Daniel 1993; Naasani 1995; Tamai 1997, Takahashi 1998) und PepT1 (Bretschneider 1999) charakterisiert werden. Zusätzlich wurden weitere Peptidomimetika wie Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren (Akarawut 1998, Lin 1999), Virustatika (Ganapathy 1998, Balimane 1998, Amidon 1999, Guo 1999) und Antimetabolite wie Bestatin (Inui 1992) als Substrate identifiziert.

Die enterale Funktion des intestinalen Peptidtransporters PepT1 ist die Resorption von Di- und Tripeptiden aus der Darmflüssigkeit zur Bereitstellung von Stickstoffgruppen und Aminosäuren für den Organismus. Bisher konnte man PepT1 aus dem Dünndarm von unterschiedlichen Organismen klonieren (Kaninchen (Boll 1994), Mensch

(Chen 1986). Die beiden ATP-Bindungsstellen des P-GP sind gleichmäßig auf die homologen Hälften verteilt. Die ATPase Aktivität wird durch Substratbindung stimuliert (Shapiro 1994), wobei P-GP generell eine hohe basale ATPase Aktivität besitzt und ATP auch ohne Substrat hydrolysiert werden kann. ATP selbst ist nicht notwendig für die Bindung des Substrates an P-GP, obwohl ATP-Bindung und -Hydrolyse erforderlich für den P-GP-vermittelten Stofftransport sind (Shapiro 1995).

Bislang konnten drei Isoformen des P-GP-exprimierenden Genes MDR, das auf dem Chromosom 7 lokalisiert ist (Wacher 1995), in unterschiedlichen Spezies nachgewiesen werden: in Ratte und Maus *mdr1-3* und im Menschen MDR1 und MDR3. Alle drei Isoformen werden in normalen Geweben exprimiert, jedoch nur die Isoformen 1 und 2 (MDR1 und *mdr1*, *mdr2*) mit dem Phänotyp der Multidrug-Resistenz assoziiert.

MDR1 wurde im intestinalen Epithel, Endothelzellen, natürlichen Killerzellen und Blutlymphozyten nachgewiesen, während MDR2 in der Nebennierenrinde und MDR3 in Hepatozyten sowie im Herz lokalisiert ist (Krishna 2000).



Anhand immunohistochemischer Nachweise konnte gezeigt werden, dass P-GP auch im physiologischen Gewebe verbreitet ist (Cordon-Cardo 1990, Thiebaut 1989). In der Leber ist P-GP auf die Gallenkanäle und in anderen polarisierten Zellen auf die sekretorischen Domänen der Plasmamembran beschränkt. Die Expression auf der luminalen Seite in den Epithelien der Niere, Leber, Nebenniere, des Darms (inkl. Colon), des Uterus und des Gehirns zeigt, dass P-GP in diesen Geweben mit epithelialen Transportfunktionen und einer prädictiven Rolle in der Vermittlung des Xenobiotikaeffluxes (z.B. in Galle, Darm und Niere) verbunden ist. Gleichzeitig wird aber die Permeation und Persistenz von hydrophoben Stoffen in spezifische anatomische Kompartimente

Abbildung 8: Schematische Darstellung des P-GPs mit Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen sowie relevanten Bindungsstellen für Antikörper (extern: MRK 16, intern: C219) und ATP (nach Tsuji 1996)

(Gehirn (BHS), Plazenta, Testis) einschränkt. Die transepitheliale Permeabilität eines P-GP-Substrates hängt dabei nicht allein von der passiven Permeabilität durch die apikale Membran ab, sondern gleichzeitig auch von der Affinität zur aktiven Transportseite und der maximalen Transportkapazität, die u.a. vom P-GP-Gehalt in der Membran bestimmt wird (Hunter 1997). Da P-GP während der Schwangerschaft stark auf der luminalen Seite des sekretorischen Epithels (Maus Uterus und Mensch Plazenta) exprimiert wird, nimmt man an, dass es in diesen Organen hormonell induziert wird und die Kombination von Estrogenen und Progesteron zu hohen P-GP-Konzentrationen im uterinen sekretorischen Epithel führen, aber nicht die Plazenta und den Fötus erreichen (Gatmaitan 1993).

Um die Multidrug-Resistenz zu überwinden, wurden im Prozess der Chemosensibilisierung Zytostatika zusammen mit einem P-GP-Inhibitor appliziert, um ausreichende intrazelluläre Konzentrationen des Chemotherapeutikums zu erreichen.

Eine große Gruppe von Substanzen unterschiedlichster Strukturen wurde identifiziert, die P-GP inhibieren und somit die Multidrug-Resistenz aufheben. Bedingt durch die Strukturvielfalt wurde ein Klassifikationssystem eingeführt, das die Modulatoren/Hemmer hinsichtlich ihrer Aktivität in 3 Gruppen zusammenfasst (Krishna 2000).

Gruppe 1 umfasst therapeutisch wirksame Stoffe, die P-GP in vitro in höheren als den therapeutisch wirksamen Konzentrationen hemmen und demzufolge relativ toxisch sind:

- ⇒ Chemotherapeutika (Anthracycline, Etoposid) (Seelig 1998), Calciumkanalblocker (Verapamil), Calmodulinantagonisten (Trifluoperazin, Chlorpromazin), Indolalkaloide, Antibiotika (Pristinamycin), Chinin, Chinidin, Peptide (Cyclosporin A), β -Blocker (Celiprolol, Talinolol) (Tsuji 1996, Spahn-Langguth 1998).

In der Gruppe 2 werden nichttoxische Analoga der ersten Generation zusammengefasst, die eine höhere Potenz und geringere Toxizität als die Gruppe 1 besitzen:

- ⇒ Verapamil-Strukturanaloga (Gallopamil, Emopamil), CsA-Analoga PSC 833 (Krishna 2000).

Die Entwicklung der Gruppe 3 der P-GP-Hemmer basierte auf Struktur-Aktivitätsbeziehungen und kombinatorischer Chemie, so dass eine effektive Hemmung bei Konzentrationen im Nanomolbereich möglich ist:

- ⇒ Diketopiperazin LY335979, (Dantzig 1996), Diketopiperazin XR9051 (Newman 2000).

1.2.3.3.2. *Multidrug resistance-associated Protein (MRP)*

Der zweite Resistenzmechanismus, der neben dem P-GP in die Multidrug-Resistenz involviert ist, stellt die Expression des 190 kDa multidrug resistance-associated protein (MRP1) dar, das auf dem Chromosom 16 lokalisiert ist (Loe 1996) und zuerst von Cole (1992) in einer Doxorubicin-resistenten Lungenkarzinomzelllinie (small cell lung carcinoma cell line (SCLC)) charakterisiert wurde.

Bisher konnten fünf MRP-Subtypen (MRP1-5) des aus 1531 Aminosäuren (Loe 1996) bestehenden Proteins identifiziert werden, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (Kool 1997).

Die Expression von MRP1 ist in fast allen Zellen des menschlichen Organismus nachgewiesen worden. Die Gewebeverteilung des MRP1 ist ähnlich der des P-GP's (in hämatopoetischen Zellen (Cole 1992), Skelettmuskel, Herz, Lunge, Niere und Brush-Border-Membran der Enterozyten des Darmes) und im Gehirn und in der Leber, wo nur geringe MRP-Konzentrationen zu finden sind. Aber auch in vielen nicht-P-GP-exprimierenden MDR-Zelllinien (Hendrikse 1999) wurde MRP1 nachgewiesen.

Im Gegensatz dazu wird die Isoform MRP2, ein kanalikulär multispezifischer Anionentransporter (cMOAT), an den kanalikulären (apikalen) Membranen der Hepatozyten exprimiert (Oude Elferink 1994). Obwohl die intrazelluläre Verteilung unterschiedlich ist, besteht eine gute Übereinstimmung zwischen dem basolateral lokalisierten MRP1 und MRP2/cMOAT (Hendrikse 1999). Das Auftreten von MRP2/cMOAT auf der apikalen Seite der Enterozyten (Suzuki 1998) beinhaltet eine Sekretion von organischen Anionen (Vries 1989, Saitoh 1996) und Glutathionkonjugaten. Dieser Transporter wurde in hohem Maße auch in der (apikalen) Membran der Gallenkanäle der Hepatozyten nachgewiesen (Paulusma 1996).

Gotoh (2000) zeigte, dass die cMOAT-Expression in den einzelnen Darmabschnitten unterschiedlich stark ausgeprägt ist, wobei sie im Jejunum am höchsten ist, gefolgt vom Duodenum. In wesentlich geringerem Ausmaß wird cMOAT im Ileum und Colon exprimiert. Generell ist die MRP2-Konzentration aber im Darmgewebe schwächer als in der Leber (Ito 1997).

Wie MRP2 ist auch MRP3 vorwiegend in der Leber zu finden und ist hier in der basolateralen Membran der Hepatozyten und Enterozyten lokalisiert (Gotoh 2000).

Die Isoformen MRP4 und MRP5, deren Funktion bis heute noch nicht näher spezifiziert wurde, werden in verschiedenen Geweben (Lunge, Niere, Blase und Mandeln) in geringer Menge exprimiert (Kool 1997).

MRP1 transportiert LCT4, Steroidglucuronide, Gallensalzderivate, Glutathionkonjugate und andere hydrophobe anionische Substanzen (Jedlitschky 1994), wobei jedoch die höchste MRP-Affinität für das LCT4 beschrieben wurde. Es konnte auch gezeigt werden, dass MRP1 eine geringe Resistenz gegenüber Paclitaxel und Colchicin, den affinsten Substraten für P-GP, besitzt, aber auch Substrate wie Doxorubicin, Calcein und Vincristin "akzeptiert" werden. Seit längerer Zeit wird Vincristin als Modellsubstrat für MRP1 angesehen, dessen Transport aber nur bei Präsenz von Glutathion (GSH) möglich ist (Loe 1996). Man nimmt an, dass GSH direkt mit MRP1 interagiert und diese Interaktion notwendig für den Transport ist, bzw. dass Vincristin und GSH einen Komplex bilden, der Substrat für MRP1 ist (Loe 1996).

Substrate für cMOAT sind Indometacin, Probenecid, Genistin, Vanadat, Ouabain (Leier 1994).

MRP-Modulatoren oder Chemosensibilisierer, die strukturell verschiedenen Substanzgruppen entstammen, sind potentiell interessant, um den klinischen MDR-Phänotyp aufzuheben (Ford 1990). Dabei sind Verapamil und Trifluoperazin für P-GP von Bedeutung, weniger spezifisch aber für eine MRP-assoziierte Resistenz. Ähnliche Affinitäten und Selektivitäten weisen Nicardipin, Kininase C Inhibitor GF109203X und der LTD4-Rezeptorantagonist MK571 auf.

Vergleicht man die ABC-Transportproteine P-GP und MRP, die beide eine sekretorische Funktion besitzen, so zeigt sich nur in 18% der Aminosäuren eine Homologie, die hauptsächlich in der Nukleotidbindungsdomäne zu finden ist. Aber trotz der geringen Übereinstimmung in der Primärstruktur, sind die hydropathischen Profile der beiden Proteine (bei Orientierung am C-Terminus) sehr ähnlich (Gao 1998). Mutationsuntersuchungen haben gezeigt, dass die erste transmembranäre Domäne aus 6 Untereinheiten besteht und der N-Terminus des MRP extrazellulär angesiedelt ist (Hipfner 1997).

Die Proteine aus der ABC-Transporterfamilie haben eine gemeinsame molekulare Architektur, die auch beim MRP aus z.B. zwei großen transmembranären Domänen mit 6 kurzen transmembranären Segmenten (Endicott 1989, Gottesman 1993, Higgins 1992, Cole 1992) und zwei ATP-bindenden Einheiten im Zytoplasma besteht (Higgins 1992). Zur Zeit ist keine allgemein anerkannte dreidimensionale Kristallstruktur des MRP-Moleküls verfügbar.

Cole (1992) sagte eine transmembranäre Topologie des MRP voraus, die aus 2 membrangebundenen Segmenten, die 12 transmembranäre Domänen umfassen, besteht und 3 extrazelluläre N-Glykosylierungsstellen enthält. Dabei sind 8 Helices im N-terminalen Teil und 4 transmembranäre Helices im C-terminalen Teil lokalisiert (Cole 1992).

Untersuchungen von Bakos (1996) ergaben, dass MRP aus 18 transmembranären Regionen, verteilt auf drei membrangebundene Segmente, mit 2 Nukleotidbindungsstellen besteht, die jeweils durch große zytoplasmatische Schleifen voneinander getrennt sind. Die Rolle der dritten Region konnte aber bislang noch nicht geklärt werden. In diesem Modell wurden, basierend auf einer Hydrophobizitätsanalyse, in der N-terminalen Region zwei extrazelluläre N-Glykosylierungsstellen gefunden. Die Glykosylierung der zweiten transmembranären Domäne ist dabei weniger wahrscheinlich (Bakos 1996).

Die beiden ATP-Bindungsstellen des MRP liegen in den zytoplasmatischen Schleifen im Zellinneren. Die Funktion der Glykosylierung ist bislang noch nicht geklärt, denn Glykosylierungsinhibitoren zeigen keine Beeinflussung der Transport- und Resistenzfunktion, haben aber möglicherweise Einfluss auf die Stabilität und das "MRP-Processing", d.h. MRP-Funktionalität und -Entwicklung, (Loe 1996). Die Phosphorylierung von MRP, die hauptsächlich an den Serinresten (Ma 1995) stattfindet, konnte durch Inkubationen mit Kininase C-Inhibitoren gesenkt werden, was sich in einer steigenden Akkumulation von Substanzen (Loe 1996) äußerte.

Der Wirkungsmechanismus des MRP unterscheidet sich von dem des P-GP und kann als Glutathion S-Konjugat-Effluxpumpe (GS-X-Pumpe) beschrieben werden (Versantvoort 1995, Hunter 1997).

1.2.3.3.3. Organischer Kationentransporter (OCT)

Im Vergleich zu den ATP-abhängigen Transportsystemen (P-GP, MRP) repräsentiert die Familie der organischen Kationentransporter (OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1 und OCTN2) ein elektrogenes, pH-unabhängiges und sättigbares Transportsystem.

Der potentialsensitive Transporter nutzt das Membranpotential der Zelle als treibende Kraft, um Stoffe von der wässrigen extrazellulären Phase ins Zellinnere zu transportieren. Das Transporterprotein (62 kDa), das auf dem Chromosom 1q11-12 lokalisiert (Koehler 1996) ist, besteht aus 556 Aminosäuren, die 12 transmembranäre Domänen (Zhang 1997) bilden und 5 Phosphorylierungs- und 3 Glykosylierungsstellen enthalten (Giacomini 1997)

Der OCT1 wurde sowohl aus der Ratte (rOCT1, Schweifer 1996), dem Kaninchen (Terashita 1998), als auch aus humanen Geweben (hOCT1, Gorboulev 1997; Zhang 1997) isoliert. Vergleicht man die Homologie der Aminosäuresequenz der verschiedenen Spezies, so besteht zwischen Ratte und Maus eine 95%-ige Identität der Aminosäuren in der OCT1-Sequenz, beim Vergleich der Ratte mit dem Menschen sind 78% und dem Kaninchen 81% der Aminosäuren homolog.

In allen Spezies wird OCT1 in der Leber exprimiert, ist aber in Ratte, Maus und Kaninchen auch in der Niere und im Dünndarm lokalisiert. Durch immunohistochemische Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass rOCT1 sowohl in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten (Meyer-Wentrup 1998) als auch in der basolateralen Membran des Darmes und in der Niere (basolaterale Membran des proximalen Tubulus) lokalisiert ist (Karbach 2000). Im Gegensatz dazu wurde der OCT2 im Darm, aber auch in Geweben wie Niere, Myokard, Plazenta und Gehirn detektiert (Wu 1999). Der OCT3 wird vor allem in der Plazenta

exprimiert. Strukturell ist der Carrier OCTN1 vergleichbar mit dem OCT1. Er besitzt eine ähnliche molekulare Struktur und Größe und transportiert ebenfalls Kationen, weist aber eine Bindungsstelle für Nukleotide auf, die dem OCT1 fehlt und den Namen OCTN erklärt. Der Carrier (OCTN1) wird vor allem in der Niere, Trachea, im Knochenmark sowie in fetaler Leber exprimiert, in adulter Leber aber nicht gefunden. Kurze Zeit nach OCTN1 wurde OCTN2 kloniert, ein Transportprotein mit naher struktureller Verwandtschaft zu OCTN1 (Tamai 1998), das ebenfalls in der Niere, aber auch im Gehirn, Prostata, Muskel und Herz lokalisiert ist.

Funktionelle Studien haben gezeigt, dass mit Hilfe des OCT1 eine Vielzahl von einwertigen kationischen Substraten, wie z. B. Tetraethylammonium (TEA), 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP), N-1-Methylnicotinamid (NMN), Cholin und Dopamin transportiert werden (Gründemann 1994), aber auch hydrophobe mehrfachgeladene Kationen (Chinin, Chinidin, Tubocurarin und 2'-Desoxytubercidin) akzeptiert werden. Mit Cyanin 863, Thiamin und Desipramin ist eine Inhibition des OCT1 möglich. Dies zeigt, dass dieses Membranprotein auch für den Transport von Arzneistoffen essentiell ist. Die Transportfunktion von OCTN2 wird zum Beispiel von Cimetidin, Procainamid, Nikotin, Verapamil, Emetin sowie verschiedenen Fluorochinolonen und Cephalosporinen gehemmt und gibt einen Hinweis darauf, dass diese Substanzen auch transportiert werden (Wu 1999, Ohashi 1999, Ganapathy 2000). Man weiß, dass OCTN2 vor allem endogene Substanzen, wie Carnitin und Carnitinderivate (Acetylcarnitin) Na^+ -abhängig durch die Membran transportiert. Die Energie für diesen Transport stammt demzufolge vom Natriumgradienten, der zwischen dem Extrazellularraum und dem Zytosol durch die Membran-ATPase aufrechterhalten wird. Die Funktion von OCTN2 umfasst aber nicht nur den Transport von endogenen, sondern auch von exogenen Substanzen wie Arzneistoffen.

Die Substrate des OCT werden sehr oft auch von P-GP akzeptiert, so dass es experimentell teilweise schwierig ist, in Transportstudien zwischen den beiden Transportsystemen zu unterscheiden (Dutt 1994).

1.3. Pharmakokinetische Interaktionen unter besonderer Berücksichtigung der Absorption

1.3.1. Allgemeine Aspekte

Eine Substanzinteraktion führt zu einer Modifikation der erwarteten Arzneistoffwirkung in einem Individuum. Substanzinteraktionen, die zu nachteiligen Reaktionen im Patienten führen, sind unbeabsichtigt, jedoch können Substanzinteraktionen auch gewollt sein, um eine verbesserte therapeutische Wirkung zu erzielen bzw. ein praktischeres Dosisregime zu erlauben (Moyle 2001). Substanzinteraktionen schließen Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen, Arzneistoff-Nahrungs-Interaktionen und Chemikalien-Arzneistoff-Interaktionen (z.B. Interaktionen mit Alkohol oder Tabak) ein.

Im Allgemeinen steigt die Frequenz möglicher Arzneistoff-Interaktionen mit zunehmender Anzahl von gleichzeitig applizierten Arzneistoffen, mehreren Therapeuten und Verordnungen, geringer Patientencompliance und Risikofaktoren des Patienten, wie z.B. Krankheitsanfälligkeit oder zunehmendes Lebensalter. Verschiedene dieser Faktoren stehen in Wechselbeziehung zueinander. Beispielsweise ist bei älteren und krankheitsanfälligen Patienten eine multiple Arzneistofftherapie wahrscheinlicher. Die klinische Signifikanz und Stärke einer möglichen Interaktion kann als stark, mittel und gering klassifiziert werden.

In Bezug auf die Wahrscheinlichkeit einer Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktion unterscheidet man *bestehende*, *wahrscheinliche*, *mögliche* oder *unwahrscheinliche* Interaktionen.

Pharmakokinetische Substanz-Substanz-Interaktionen werden allgemein nach dem ADME-System klassifiziert, welches Absorption, Verteilung (Distribution), Metabolismus und Elimination beinhaltet. Ein alternatives mechanistisches Klassifikationssystem teilt die Substanz-Substanz-Interaktionen ein in:

- ⇒ Substanz-Substanz-Interaktionen basierend auf Reaktionen mit einem oder mehreren Makromolekülen,
- ⇒ physikochemische Interaktionen und Interaktionen, die aus Veränderungen des lokalen pH-Wertes verbunden mit Veränderungen des Ionisationsstatus der Moleküle resultieren und auf
- ⇒ pharmakodynamische Mechanismen zurückzuführende Interaktionen.

Substanz-Substanz-Interaktionen, die durch Beeinflussung von Makromolekülen zustande kommen, können verursacht werden durch

- ⇒ die Blockade der Bindungsstellen des Arzneistoffes durch einen Kompetitor,
- ⇒ einen Wechsel im Bindungsverhalten eines Stoffes zu einem Makromolekül durch ein anders vorhandenes interagierendes Molekül, oder
- ⇒ eine Veränderung in der Anzahl der vorhandenen Makromoleküle, z.B. die Zunahme metabolisierender Enzyme bei Enzyminduktion (Marroum 2002).

1.3.2. Beispiele für Interaktionen basierend auf der Wechselwirkung mit Makromolekülen

1.3.2.1. Beeinflussung der metabolischen Clearance als Interaktionsmechanismus

Eine Vielzahl bekannter Medikamente wurde in den letzten Jahren trotz präklinischer Sicherheitsbewertung (z.B. Mibefradil) wegen verschiedener Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen zurückgezogen. Diese interagierenden Arzneistoffe, aber auch andere wie z.B. Chinidin, Digoxin, Cyclosporin A, Terfenadin und Metoprolol, werden zum größten Teil durch Cytochrom-P-450-abhängige mikrosomale Enzyme metabolisiert.

Eine Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktion zwischen Sorivudin und 5-Fluoruracil führte zu einer Intoxikation, die verursacht wurde durch die irreversible Hemmung der Dihydropyridindehydrogenase, einem im Darm exprimierten Enzym (Kanamitsu 2000).

Potentielle Interaktionen mit anderen Arzneistoffen können in In-vitro-Studien z.B. mit humanen Lebermikrosomen bzw. -enzymen getestet werden. Dieser erste Screen wird zur Identifizierung von interagierenden Substanzen in der Zielpopulation häufig angewendet.

Interaktionen, die auf Biotransformationsreaktionen basieren, können präsystemisch z.B. auf gastrointestinaler und hepatischer Ebene (gastrointestinaler und hepatischer First-pass-Effekt) auftreten und folglich neben der Clearance auch die perorale Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes beeinflussen. Insbesondere für Arzneistoffe, die nur in geringem Maße über die Leber eliminiert werden (low hepatic-extraction drugs, $E < 0,2$) ist die Clearance hauptsächlich abhängig von der - auf der Enzymaktivität basierenden - intrinsischen Clearance und nicht vom Leberblutfluss. Geringe Veränderungen in der Arzneistoffclearance, z.B. durch Enzyminduktion oder -hemmung, führen bei diesen Arzneistoffen zu starken Veränderungen der Substanzclearance. Arzneistoffe hingegen, die einer hohen hepatischen Extraktion unterliegen (high hepatic-extraction drugs, $E > 0,6$) besitzen eine intrinsische Clearance, die höher ist als der Leberblutfluss. Die Clearance dieser Arzneistoffgruppe wird hauptsächlich durch den Leberblutfluss bestimmt und ist (beim Lebergesunden) nicht abhängig von der intrinsischen hepatischen Clearance.

Enzyminhibition: Anhand der K_i -Werte der Arzneistoffe aus den oben genannten In-vitro-Studien ist es möglich, die Wahrscheinlichkeit von Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen abzuschätzen. Im Falle einer reversiblen Enzymhemmung gilt eine Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktion als sehr wahrscheinlich, wenn der K_i -Wert kleiner als $1 \mu\text{M}$ ist (Schoolar Reynolds 2000). Liegt der K_i -Wert zwischen 1 und $50 \mu\text{M}$, ist eine Interaktion möglich. Bei Werten größer als $50 \mu\text{M}$ wird eine Interaktion meist ausgeschlossen. Bei einer irreversiblen Enzymhemmung geht man bei K_i -Werten von unter $20 \mu\text{M}$ von einem Interaktionspotential der Substanz aus. Liegen die K_i -Werte zwischen 20 und $100 \mu\text{M}$ besteht ein gewisses und bei mehr als $100 \mu\text{M}$ ein geringes Potential für In-vivo-Interaktionen. Bei Ermittlung der K_i -Werte kann es aber auch zu geringeren Werten als tatsächlich vorhanden kommen.

Der prädiktive Wert dieser In-vitro-Studien ist geringer, wenn die Inhibitor-Konzentration am Enzym aufgrund von lokaler Akkumulation oder aktiven Transportprozessen nicht dem angenommenen Wert entspricht.

Enzyminduktion: Zusätzlich zur Enzyminhibition wurden auch Prozesse der Enzyminduktion durch verschiedene Xenobiotika beschrieben. Sowohl Arzneistoffe (z.B. Phenobarbital, Rifampicin) als auch Umweltschadstoffe (z.B. Zigarettenrauch) und Nahrungsmittel können die Synthese von Cytochrom-P-450-Proteinen verstärken. Der Induktionsprozess kann zu abnehmenden Plasmakonzentrationen der applizierten Muttersubstanz führen und gleichzeitig ansteigende Metabolitenkonzentrationen bedingen.

1.3.2.2. Wechselwirkungen an Transportern als Ursache pharmakokinetischer Interaktionen

Zusätzlich zur Clearance über Phase I- oder Phase II-Biotransformationsprozesse, kann die Elimination von Muttersubstanzen und/oder ihren Phase I- und Phase II-Metaboliten aus der systemischen Zirkulation auch einem Carrier-vermittelten Transport unterliegen. Die Transporter-vermittelte Elimination von polaren Phase II-Metaboliten wurde zeitweise auch als Phase III der Arzneistoffelimination bezeichnet (Vore 1994), obwohl die gleiche Terminologie angewandt wurde für den Metabolismus der Phase II-Metaboliten im Sinne von Dekonjugationsreaktionen, die zu einer Rückbildung der Muttersubstanz führen.

Carrier-vermittelte absorptive Prozesse sind sättigbar und hemmbar. Der Anteil der jeweiligen Transportprozesse in der Absorption von Arzneistoffen bestimmt die Relevanz von sättigbaren Mechanismen. Hohe passive Permeabilitäten vermindern möglicherweise die Relevanz von Carrier-vermittelten zelleinwärts (inside) und zellauswärts (outside) gerichteten Transportprozessen, auch wenn die Affinitäten der Substrate zum jeweiligen Transporter hoch sind. Wie beim Arzneistoffmetabolismus können die Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen an Transportern im Prinzip in zwei unterschiedliche Arten von Mechanismen eingeteilt werden:

- ⇒ Hemmung (Reduktion) oder Steigerung des Substanztransportes durch kompetitive/nichtkompetitive Hemmung der Bindung oder des Transportes oder auch Zunahme des Transportes durch nichtkompetitive Interaktion mit dem Transporter, und
- ⇒ Veränderung der Transporterexpression, d.h. Veränderung in der Anzahl der Proteinmoleküle, die für den Substanztransport zur Verfügung stehen (Induktion oder reduzierte Expression).

Stärker relevant in dieser Beziehung erscheint die Transporthemmung und -induktion der Transporterexpression zu sein. Transporthemmung im Darm führt z.B. zu einer Abnahme der Bioverfügbarkeit (F), wenn ein nach innen gerichteter (inside-directed) Transportprozess gehemmt ist, oder zu einer Zunahme von F, wenn ein nach außen gerichteter Transport gehemmt ist. Passive Prozesse sind durch Veränderungen in der Transporterfunktion und Transporterexpression nicht betroffen.

Eine Induktion sekretorischer Transporter führt zu einer Abnahme des transepithelialen apikal-basolateralen Transportes in Abhängigkeit von der Änderung der Expression des sekretorischen Carriers.

Eine Induktion von Transportern, die verantwortlich sind für einen absorptiven Carrier-vermittelten Prozess, äußert sich in einer Zunahme des apikal-basolateralen Fluxes und z.B. einer ansteigenden Bioverfügbarkeit.

Im Allgemeinen werden zwei unterschiedliche Zustände - unter Berücksichtigung der Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen auf Transport- oder Metabolismusbasis - in Betracht gezogen:

- ⇒ Ein *Arzneistoff beeinflusst* die Pharmakokinetik der gleichzeitig applizierten Substanz.
- ⇒ Ein *Arzneistoff wird beeinflusst* durch die gleichzeitig applizierte Substanz.

Beispielsweise führt eine Coadministration von Substraten des Effluxtransporters P-Glykoprotein (P-GP) zu pharmakokinetischen Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen (z.B. Interaktion des β -Blockers Talinolol bei gleichzeitiger Gabe von Verapamil (Spahn-Langguth 1998, Gramatte 1999) und Erythromycin (Schwarz 2000), die sich in einem Anstieg der Bioverfügbarkeit äußern. Außerdem konnte mit Hilfe einer Vielzahl von In-vitro-, In-situ- und In-vivo-Techniken gezeigt werden, dass die intestinale Sekretion von Talinolol durch verschiedene P-GP-Substrate/Hemmer sättig- und hemmbar ist (Hanafy 2001).

Interessanterweise wurde auch in der letzten Zeit beschrieben, dass auch Nahrungsbestandteile mit Carriern interagieren können (Wagner 2001, Dresser 2002). Dies bestätigen auch neueste Untersuchungen mit Grapefruitsaft (Soldner 1999), Rotwein (Tsunoda 2001) und grünem Tee (Jodoin 2002).

Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen, die auf Transporter zurückzuführen sind, wurden z.B. für eine Vielzahl von organischen Anionen beschrieben, z.B. kann die renale und intestinale Sekretion des Schleifendiuretikums Furosemid durch Indometacin gehemmt werden. Für Indometacin ist seit langem

bekannt, dass es die renale Clearance vieler anionischer Xenobiotika hemmt (Flanagan 1999), es wurde aber bisher keinem einzelnen Transporter zugeschrieben. Heute wird der Einfluss von verschiedenen Transportern diskutiert, wie z.B. dem organischen Anionentransporter (OAT) in der Niere und dem Multidrug resistance-associated Protein (MRP).

Viele Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen gehen hervor aus einer konkurrierenden Gabe von Arzneistoffen, die sowohl Substrate und Induktoren der CYP3A4- und MDR1-Expression sind. Eine Langzeittherapie mit Substanzen, die CYP3A4 und MDR1 induzieren, steigert beispielsweise die systemische Clearance von antileukämischen Substanzen und führt so zu einer geringeren Überlebenschance (Relling 2000). Neue Studien zeigen auch, dass der Steroid- und Xenobiotikarezeptor (SXR), der sowohl in der Leber als auch im Darm exprimiert wird, über koordinierte Mechanismen eine zentrale Rolle in der CYP3A4-, CYP2C8- und P-GP-Regulation spielt (Schuetz 2001, Synold 2001). Da einige Arzneistoffe (Rifampicin, Johanniskrautextrakt) sowohl die Bildung metabolischer Enzyme als auch die Expression von P-GP induzieren, war die Hypothese der Coregulation/Coexpression bereits vor einigen Jahren formuliert worden.

Wie bei biotransformierenden Enzymen, so sind auch auf dem Gebiet der Transporter Polymorphismen gefunden worden. So wurden z.B. für das MDR1-Gen (ABCB1) fünfzehn verschiedene Polymorphismen beschrieben, von denen 12 zu keiner Veränderung der Proteinsequenz führen (Hoffmeyer 2001). Ebenfalls wurden ethnische Unterschiede im MDR1-Polymorphismus detektiert.

Erste Daten zum Ausmaß der Transporterinduktion z.B. durch Rifampicin lassen vermuten, dass das Ausmaß der Transporterinduktion abhängig vom Genotyp ist, was für das MDR1-Genprodukt P-GP gezeigt werden konnte (Hoffmeyer 2000).

Im Falle eines Screenings von potentiellen Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen ist es hilfreich, die zu betrachtende Substanz zusammen mit verschiedenen Modellsubstanzen zu untersuchen. Sehr lipophile, kaum metabolisierte und gut diffundierende Substanzen können, auch wenn sie P-GP-Substrate sind, ohne Weiteres die Membranen passieren und werden häufig vollständig resorbiert.

Substanzen, die bekanntermaßen P-GP-Substrate sind und bereits mehrfach als Modellsubstanzen in klinischen Studien eingesetzt wurden, sind Talinolol, Fexofenadin und Digoxin. Diese Substanzen sind durch ein intermediäres Lipophilie/Hydrophilie-Verhältnis sowie ausreichende passive Permeabilität charakterisiert. Alle drei Arzneistoffe zeigen pharmakokinetische Gemeinsamkeiten, sie werden in nur geringem Ausmaß metabolisiert, besitzen eine hohe nichtmetabolische Clearance, während der metabolische Substratverlust keine signifikante Rolle spielt.

2. Problemstellung

Für verschiedene Substanzen wurde in den vergangenen Jahren bereits eine verringerte Bioverfügbarkeit aufgrund einer Sekretion in das intestinale Lumen beobachtet. Dies schließt nicht nur die Sekretion über die Gallenflüssigkeit ein, wobei Reabsorption und enterohepatischer Kreislauf möglich sind, sondern auch den aktiven Transport durch das intestinale Epithel in das Darmlumen. Die Relevanz von Transporter-vermittelten Effekten auf den Arzneistofftransport gewinnt immer mehr an Bedeutung in der Arzneistoffentwicklung. Bei der Interpretation von kinetischen Charakteristika wird z.B. P-GP immer stärker als Erklärungsmöglichkeit für variable Absorptionsprofile und geringe Bioverfügbarkeit in Betracht gezogen.

Mit Hilfe von Rezeptorbindungsstudien (Soldner 1996 (1)) konnte nachgewiesen werden, dass der aktive Metabolit des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Losartan, das EXP 3174, eine signifikant höhere Rezeptoraffinität aufweist als die Muttersubstanz. Aufgrund der im Vergleich mit Losartan ebenfalls höheren Plasmaproteinbindung ist in vivo nur mit einer um 50% höheren AT₁-Rezeptorwirkung für EXP 3174 zu rechnen. Nach Losartanapplikation wird der aktive Metabolit ebenfalls in nennenswerten Konzentrationen im Blut gefunden, die auf einen deutlichen Beitrag zum Effekt schließen lassen.

Die Arbeiten von Soldner (1996 (1)) an Ratten zeigten auch, dass bei chronischer peroraler Gabe von Losartan der relative Anteil von EXP 3174 sowohl im Blut als auch in verschiedenen Geweben mit der Zeit abnahm. In der Darmwand und im Dünndarminhalt war der Metabolit schon bei einmaliger Gabe deutlich nachweisbar und wurde bei wiederholter Gabe in höheren Konzentrationen gefunden.

Die Hypothese, dass EXP 3174 bei peroraler Gabe von Losartan schon während dessen Aufnahme in den Enterozyten der Darmwand gebildet und in das Darmlumen sezerniert wird, konnte in Inkubationsstudien mit Mikrosomen und Homogenaten aus Rattenleber und Rattendarm von Dressler (1997) nicht bestätigt werden. Die Inkubationen mit Mikrosomen, aber auch mit Homogenaten aus Rattendarm, ergaben nach Losartanzusatz keine nennenswerten Mengen an EXP 3174, zeigten aber dennoch eine schnelle Abnahme der Losartankonzentration. Eine alternative Hypothese für die hohen intestinalen EXP 3174-Konzentrationen könnte eine systemische Bildung von EXP 3174 zusammen mit ausgeprägter biliärer oder intestinaler Sekretion sein. Eine Anreicherung ergäbe sich für EXP 3174 dann, wenn die Rückresorption für das ebenfalls biliär sezernierte Losartan höher wäre als für EXP 3174.

Ausgehend von der geringen systemischen Verfügbarkeit von Losartan und dem ausgeprägten First-pass-Effekt kann angenommen werden, dass ein intestinales Countertransportsystem für die geringe Absorption von Losartan mitverantwortlich ist.

Ziele der hier durchgeführten Untersuchungen mit dem Angiotensin-II-Antagonisten Losartan und dessen aktivem Metaboliten EXP 3174, waren daher

- ⇒ in Transportstudien mit Caco-2-Zellen, zum Einen für Modellsubstanzen verschiedener aktiver und passiver epithelialer Transportsysteme, aber auch für Losartan und EXP 3174 den Einfluss experimenteller Bedingungen auf die intestinale Permeabilität zu untersuchen. Speziell für die Angiotensin-II-Antagonisten sollte dabei geprüft werden, ob und in welchem Ausmaß eine Richtungsabhängigkeit im Transportsystem besteht, die auf einen relevanten aktiven Carrier-vermittelten Transport schließen lässt. Im Bindungsassay sollten beide Substanzen auf ihre Affinität zum ABC-Transporter P-GP im Vergleich zu verschiedenen Referenzsubstanzen geprüft werden.
- ⇒ in mechanistischen Studien die Relevanz von intestinalen Transportsystemen sowie den Einfluss von Inhibitoren intestinaler Transportsysteme auf die Permeabilitäten von Losartan und EXP 3174 in vitro an Zellkulturen und in situ an der Ratte zu testen.

- ⇒ pharmakokinetische Untersuchungen an Gallengangs-kanülierten und nichtkanülierten Ratten durchzuführen, um nach getrennter Applikation von Losartan bzw. EXP 3174 die kinetischen Parameter zu vergleichen und den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der EXP 3174-Kinetik zu lokalisieren und in Studien zur Distribution nach i.v.- und p.o.-Gabe den Einfluss des P-GP-Modulators Verapamil zu untersuchen.
-

3. Ergebnisse

3.1. In-vitro-Untersuchungen an Caco-2-Zellen

3.1.1. Radioligandenbindungsassay

3.1.1.1. Beeinflussung der Bindung des Radioliganden durch Lösungsmittel und pH-Wert

Untersuchungen von Yamashita (2000) zeigten, dass die Permeabilität und der TEER von Caco-2-Zellmonolayern durch Lösungsmittelzusätze (DMSO, EtOH) beeinflusst werden. Es wurde eine Abnahme der P_{eff} -Werte und des TEERs mit steigenden Lösungsmittelkonzentrationen gefunden.

Aufgrund der Schwerlöslichkeit mancher Arzneistoffe sollte in den hier durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, ob Lösungsmittelzusätze und pH-Wertveränderungen, die zur Verbesserung der Löslichkeit genutzt werden, auch die Bindung von ^3H -Talinolol an P-GP verändern.

In Abbildung 9 ist der Effekt von Lösungsmittelzusätzen und pH-Wertveränderungen auf die P-GP-Bindungsaffinität des Radioliganden (RL) ^3H -Talinolol dargestellt. Es zeigte sich, dass bei einer maximalen Lösungsmittelkonzentration von 20% die Verdrängung des RL am stärksten war, wobei bei einem 20%-igen MeOH-Zusatz eine Abnahme der Radioaktivität von 55% zu finden war, bei einem ACN-Zusatz sank die Radioaktivität hingegen um 84%. Zusätze von EtOH und DMSO führten jeweils zu einer 64%-igen Abnahme der RL-Bindung. Sinkende Lösungsmittelzusätze ergaben einen Anstieg der Bindung von ^3H -Talinolol, der aber im Vergleich zu lösungsmittelfreien Proben trotzdem noch verringert war. Allein bei einer 0,02%-igen MeOH-Konzentration war der Einfluss minimal, alle anderen Lösungsmittel zeigten selbst bei einer 0,02%-igen Konzentration eine Verdrängung von ^3H -Talinolol.

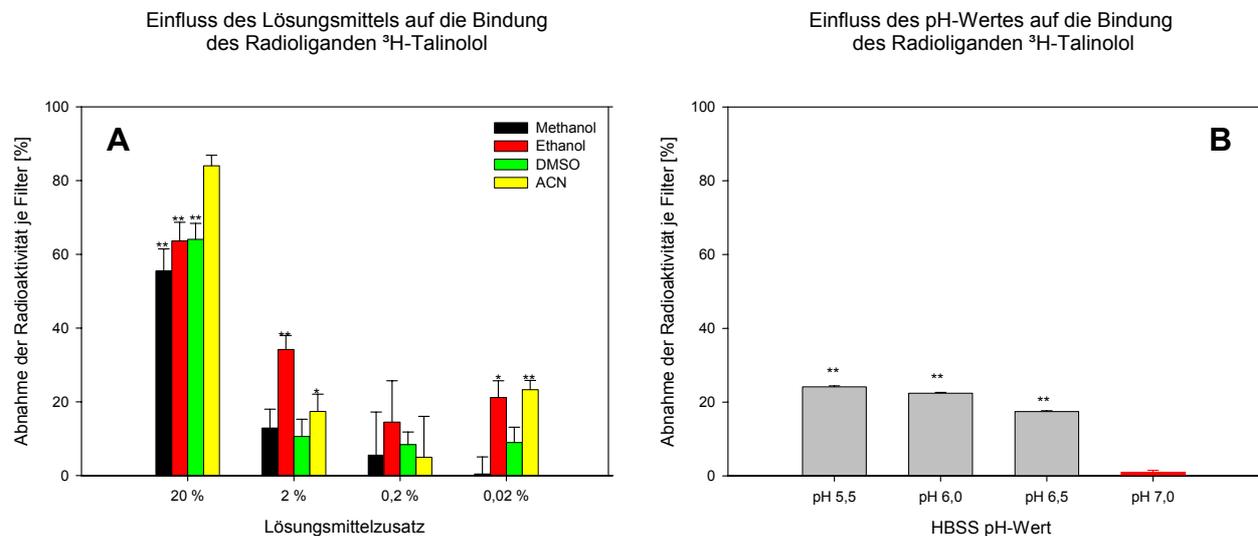


Abbildung 9: Veränderung der ^3H -Talinololbindung an P-GP durch Lösungsmittelzusätze (A) und pH-Veränderungen (B) (Mittelwert \pm SEM für $n=2$ Versuche, * $p<0,05$, ** $p<0,01$)

Wurde der pH-Wert des Inkubationspuffers, der im Normalfall 7,0 beträgt, verändert, konnte nachgewiesen werden, dass auch die Affinität des Radioliganden ^3H -Talinolol verändert war. Es zeigte sich aber deutlich, dass pH-Wertveränderungen die Bindung des Radioliganden ^3H -Talinolol nicht in dem Ausmaß beeinflussen wie z.B. Lösungsmittelzusätze. Mit sinkendem pH-Wert wurde eine Abnahme der Radioaktivität gefunden, die auf eine Verdrängung des Radioliganden schließen lässt. Im Vergleich zu pH 7,0, dem Kontroll-pH-Wert, nahm die Radioaktivität bei einem pH-Wert von 5,5 um 24% ab.

Wurden den Untersuchungslösungen des P-GP-Modellsubstrates Talinolol Lösungsmittel in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt bzw. der pH-Wert der Lösung verändert, so zeigte sich ebenfalls im Vergleich zu den Kontrollexperimenten (Inkubationspuffer ohne Lösungsmittel und pH 7,0) eine stärkere Abnahme der Radioaktivität (Abbildung 10), so dass ein deutlicher Talinololeffekt nachgewiesen werden konnte.

Wurde den Proben zur besseren Löslichkeit Methanol zugesetzt, so führten abnehmende MeOH-Konzentrationen zu keiner Veränderung der Radioaktivität. Eine Zunahme der Radioaktivität wurde bei abnehmender EtOH-Konzentration gefunden. Bei Zusatz von DMSO zeigte sich ein gegenteiliger Effekt, die Radioaktivität sank mit abnehmender DMSO-Konzentration. Die Veränderung des pH-Wertes führte zu einer Abnahme der Radioaktivität um 55% im Vergleich zum pH 7,0.

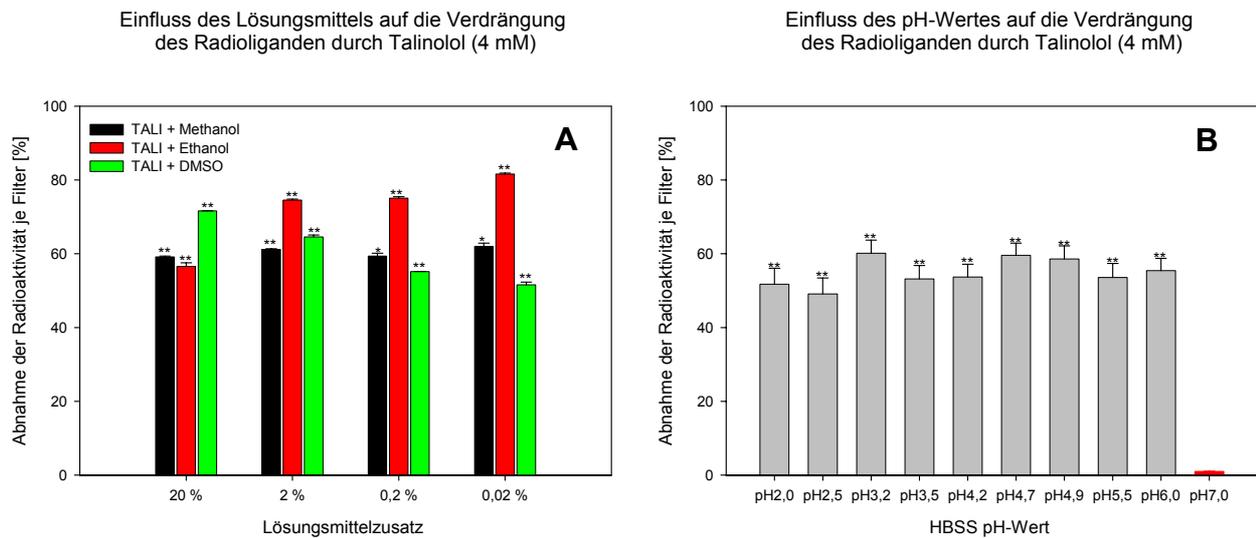


Abbildung 10: Bindung des Radioliganden ^3H -Talinolol in Verdrängungsexperimenten mit Talinolol unter Zusatz verschiedener Lösungsmittel (A) sowie bei pH-Veränderungen des Inkubationspuffers (B) (Mittelwert \pm SEM für $n=2$ Versuche, * $p<0,05$, ** $p<0,01$)

3.1.1.2. Verdrängung des Radioliganden durch P-GP-Substrate

3.1.1.2.1. Affinitätsbestimmungen durch Verdrängungsexperimente

Zur Ermittlung der P-GP-Affinität von nichtgelabelten Substanzen wurden Inkubationen mit variablen Konzentrationen der Testsubstanzen bei einer konstanten ^3H -Talinololkonzentration ($1\mu\text{M}$ und 20% ^3H -Talinolol) durchgeführt (Abbildung 11). Die Testsubstanzen waren alle im Inkubationspuffer pH 7,0 gelöst und enthielten keinen Lösungsmittelzusatz.

Tabelle 5: Übersicht der IC_{50} -Werte, erhalten aus Ergebnissen der Verdrängungsexperimente mit ausgewählten Arzneistoffen mit ^3H -Talinolol als Radioligand, und der log D-Werte, basierend auf Literaturangaben ((1) Artursson 1991, (2) Ribadeneira 1996, (3) Munk interner Report 2001, (4) Winiwarter 1998)

	Talinolol	Verapamil	Alprenolol	Losartan	EXP 3174
IC_{50}-Werte [μM]	228,10	334,24	943,57	1424,29	2207,27
log D-Werte	2,74 (3)	2,70 (4)	1,00 (1)	1,19 (2)	-1,22 (2)

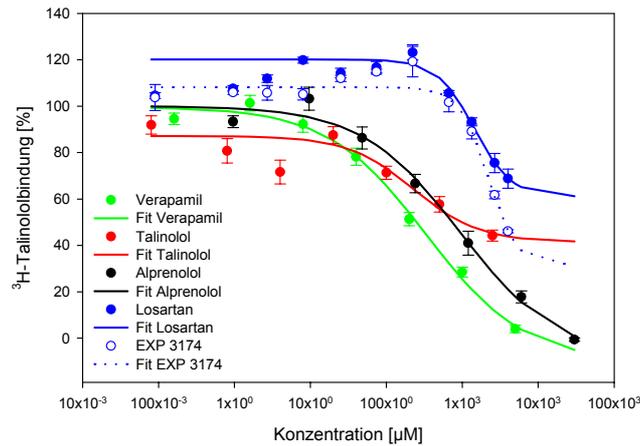
Verdrängungsexperimente mit ^3H -Talinolol als RL

Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Verdrängung des Radioliganden ^3H -Talinolol zur Berechnung der IC_{50} -Werte von Verapamil, Talinolol, Alprenolol, Losartan und EXP 3174 (12 Konzentrationen, Mittelwert \pm SEM für $n=2$ Versuche)

Die Verdrängungsexperimente mit ^3H -Talinolol als Radioligand ($1\ \mu\text{M}$ und 20% ^3H -Talinolol) zeigten Unterschiede in der Affinität der Testsubstanzen. Von den untersuchten Arzneistoffen hatte der β -Blocker Talinolol die höchste Affinität zu P-GP, was sich in einem IC_{50} -Wert von $228\ \mu\text{M}$ (Tabelle 5) äußerte. Alprenolol, aus der gleichen Wirkstoffklasse, hingegen zeigte einen um den Faktor 4 höheren IC_{50} -Wert von $944\ \mu\text{M}$. Der IC_{50} -Wert des lipophilen Calciumkanalblockers Verapamil lag bei $334\ \mu\text{M}$ und hatte eine ähnliche Größenordnung wie der von Talinolol. Für Losartan und EXP 3174 konnte ebenfalls eine Affinität zum ATP-abhängigen Transporter P-GP nachgewiesen werden. Es ergaben sich IC_{50} -Werte von $1424\ \mu\text{M}$ für Losartan und $2207\ \mu\text{M}$ für EXP 3174, die zeigen, dass die Affinität beider Stoffe im Vergleich zu den anderen getesteten Substanzen geringer ist. Für Talinolol, Verapamil und Alprenolol wurden die Verdrängungsexperimente mit unterschiedlichen Radioligandenkonzentrationen durchgeführt. Dabei wurde bei einem höheren Prozentgehalt von ^3H -Talinolol im eingesetzten Radioliganden und niedrigerer Gesamtkonzentration ($0,2\ \mu\text{M}$ und 100% ^3H -Talinolol) eine Rechtsverschiebung und bei einem geringeren Anteil und höherer Gesamtkonzentration ($5\ \mu\text{M}$ und 4% ^3H -Talinolol) eine Linksverschiebung der Kurven beobachtet.

3.1.1.3 Korrelation des IC_{50} -Wertes mit dem log D-Wert

Lipophilere Substanzen zeigten schon bei geringeren Konzentrationen eine Verdrängung des RL ^3H -Talinolol, was einer höheren Affinität zur makromolekularen Bindungsstelle entspricht und das folgende Ranking ergab:

Talinolol > Verapamil > Alprenolol > Losartan > EXP 3174

Dieser Verlauf weist auf eine Beziehung zwischen IC_{50} -Werten und Lipophilie der Testsubstanzen hin. Die Korrelation zwischen IC_{50} - und log D-Werten ist in Abbildung 12 dargestellt und beinhaltet die Korrelationsparameter, die nach linearer Regressionsanalyse erhalten wurden, wobei der Korrelationskoeffizient $r^2 = 0,9319$ betrug. Es wurde eine statistische Signifikanz der Korrelation zwischen den IC_{50} - und log D-Werten gefunden ($p = 0,05$) übereinstimmend mit dem Rank-Korrelationskoeffizienten von Spearman (Sachs 1999). Die log D-Werte wurden der in Tabelle 5 angegebenen Literatur entnommen.

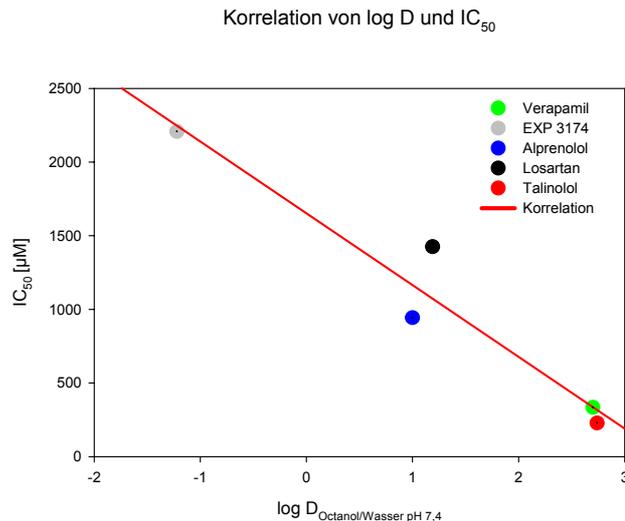


Abbildung 12: Korrelation von Lipophilie und P-GP-Affinität: log D- vs. IC₅₀-Werte

3.1.2. Transportstudien durch Caco-2-Zellmonolayer

3.1.2.1. Einfluss der Kulturdauer auf den Transport von Modellsubstanzen

3.1.2.1.1. Betrachtung elektrophysiologischer Parameter (TEER)

Die Entwicklung der Caco-2-Zellmonolayer auf Filtermembraneinsätzen (Transwells) für Transportuntersuchungen, wurde durch die Messung des transepithelialen Widerstandes (transepithelial electrical resistance (TEER)) während der Kulturzeit verfolgt.

In Abbildung 13 A ist die Abhängigkeit des TEER von der Größe der Transwells und der Kulturdauer dargestellt. Es zeigte sich deutlich, dass die Monolayer, die in Transwells mit einer geringeren Wachstumsfläche (1,13 cm²; 88000 Zellen/cm²) kultiviert wurden, einen um den Faktor 1,4 höheren TEER besaßen als die Caco-2-Zellmonolayer, die in Transwells mit einer Fläche von 4,71 cm² und 64000 Zellen/cm² wuchsen. Ebenso konnte bei geringerer Wachstumsfläche mit zunehmender Kulturzeit ein stärkerer Anstieg des TEER nachgewiesen werden. In Transwells mit größerer Wachstumsfläche wurde ebenfalls ein Anstieg des TEER während der Zeit in der Kultur gefunden, der sich aber nicht in einem vergleichbaren Ausmaß änderte, wie in den Transwells mit einer Wachstumsfläche von 1,13 cm².

Früher publizierte Untersuchungen (Sakai 1994) zeigten, dass Verapamil die Fluidität der Zellmembranen beeinflussen kann. Deshalb wurden Experimente mit unterschiedlichen Caco-2-Zellpassagen (Passage P30/31 und P78/79) durchgeführt, in denen geprüft werden sollte, ob Verapamil einen Einfluss auf die Integrität der Caco-2-Zellmonolayer unterschiedlicher Passagenummern (Passage P30/31 und Passage P78/79) hat.

Unter Einfluss von Verapamil blieb der TEER bei der jungen Passage P30/31 annähernd konstant. Bei Experimenten mit Passage P78/79 wurde eine statistisch signifikante Abnahme des Widerstandes unter Verapamileinfluss beobachtet, wobei der TEER aber über den Beobachtungszeitraum anzusteigen schien (Abbildung 13 B). Da für den Nachweis der Integrität der Zellmonolayer nicht nur der TEER von Bedeutung ist, sondern auch mit Hilfe der Permeabilität des parazellulär, passiv absorbierten Mannitols eine Aussage möglich ist, wurde der Einfluss von Verapamil auf die Mannitol-Permeabilität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die P_{eff} -Werte des Mannitols bei beiden Passagen unter Verapamil erhöht waren. Nach 2 Wochen in Kultur wurde bei der jüngeren Passage ein Anstieg um 54% und bei Passage P78/79 um 63% gefunden, nach 3 Wochen in Kultur stiegen die P_{eff} -Werte für Mannitol bei P30/31 um 149% und bei P78/79 um 54%.

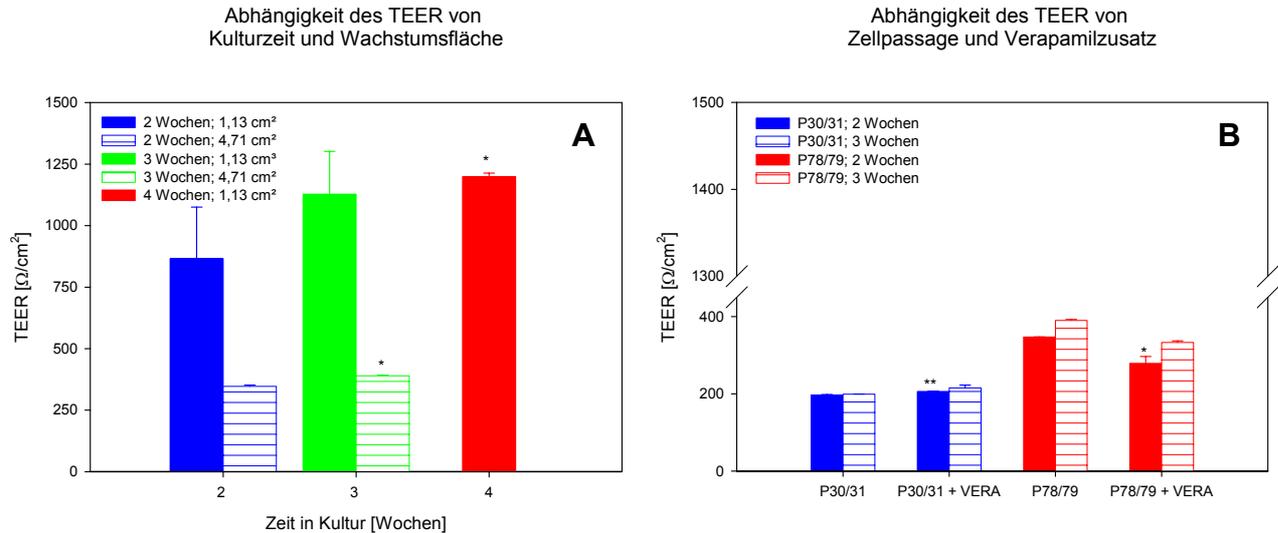


Abbildung 13 A-B: Entwicklung des transepithelialen elektrischen Widerstandes von Caco-2-Zellmonolayern innerhalb des Kulturzeitraumes:

A: Darstellung des TEER von Caco-2-Zellmonolayern der Passage P78/79 in Abhängigkeit von Kulturfläche und Kulturzeit (Mittelwert ± SEM für n=6 Versuche, *p<0,05, **p<0,01)

B: Einfluss von Verapamilzusatz und Passagehöhe (Passage P30/31, P78/79) auf den TEER von Caco-2-Zellmonolayern (Mittelwert ± SEM für n=6 Versuche, *p<0,05, **p<0,01)

3.1.2.1.2. Charakterisierung von Modellsubstanzen

In Bezug auf die Veränderungen der P_{eff} -Werte in Abhängigkeit von der Kulturdauer wurden eine Reihe von Modellsubstanzen untersucht. Ausschlaggebend für die Auswahl der verwendeten Markersubstanzen war dabei, Modellsubstanzen sowohl für aktive als auch für passive Transportprozesse zu untersuchen.

Für die Charakterisierung aktiver Transportprozesse wurden Markersubstanzen verwendet, die durch ATP-vermittelte Transportprozesse bzw. durch Symport (Cotransport) das intestinale Epithel überwinden. Untersuchungen mit dem P-GP-Modellsubstrat Talinolol dienen zur Beschreibung des Carrier-vermittelten Effluxtransportes durch die apikale Membran. Der Carrier-vermittelte Transport durch die apikale Membran im Sinne eines Symportes wurde mit den Markersubstanzen Gly-Pro (PepT1-Transporter) und L-Phenylalanin und S-Baclofen (LAT-Transporter) beschrieben.

Neben der Kanal-vermittelten Diffusion und der Carrier-vermittelten Diffusion sind auch passive Diffusionsprozesse Bestandteil des passiven Substanztransportes. In den hier beschriebenen Permeationsstudien wurden Metoprolol und Propranolol als Marker für die transzelluläre und Atenolol und Mannitol als Marker für die parazelluläre passive Diffusion verwendet.

Um den Einfluss der Kulturperiode auf aktive und passive intestinale Transportprozesse zu untersuchen, wurden Permeationsstudien durch Caco-2-Zellmonolayer mit Markersubstanzen durchgeführt. Die Permeabilitäten der verwendeten Monolayer wurden nach einer Kulturperiode von 2, 3 und 4 Wochen mit Hilfe der Modellsubstanzen ermittelt.

In allen Transportexperimenten mit aktiv absorbierten Modellsubstanzen konnte über den Kulturzeitraum von 4 Wochen ein signifikanter Anstieg der Permeabilität mit zunehmender Zeit ermittelt werden (Abbildung 14). Sowohl für die Modellsubstanzen des LAT- als auch des PepT1-Transporters wurden nach 4 Wochen höhere Permeabilitäten ermittelt als nach 2 Wochen. Nach 4 Wochen in Kultur stieg die Absorption von Gly-Pro, einer PepT1-Markersubstanz, verglichen mit den Werten nach 2 Wochen um 42% an. Für Phenylalanin (PHE) und S-Baclofen (S-BAC), Substanzen, die aktiv über den LAT transportiert werden, führte eine Verlängerung der Kulturzeit um 2 Wochen zu einem Permeabilitätsanstieg von 69% für PHE bzw. 32% für S-BAC.

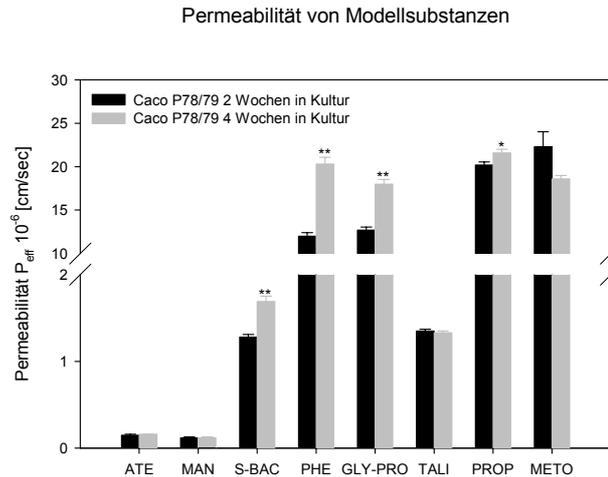


Abbildung 14: Abhängigkeit der Permeabilität [$\cdot 10^{-6}$ cm/sec] von Modellsubstanzen (ATE Atenolol; MAN Mannitol; S-BAC S-Baclofen; PHE L-Phenylalanin; GLY-PRO Gly-Pro; TALI Talinolol; PROP Propranolol; METO Metoprolol) durch Caco-2-Zellmonolayer (P78/79) von der Kulturperiode (2 und 4 Wochen) (Mittelwert \pm SEM für n=3 Versuche, *p<0,05, **p<0,01)

Der Transport von Modellsubstanzen, die passiv parazellulär absorbiert werden, wurde nicht durch das Alter der Zellmonolayer beeinflusst. Weder die P_{eff} -Werte von Mannitol (MAN) noch die von Atenolol (ATE) zeigten signifikante Unterschiede in Transportuntersuchungen mit 2 und 4 Wochen alten Zellmonolayern. Die ermittelten Permeabilitätswerte blieben weitestgehend konstant.

Experimente mit Talinolol, einem Modellsubstrat für den ATP-abhängigen Effluxtransporter P-GP (Spahn-Langguth 1998), zeigten, dass die Kulturzeit der Caco-2-Zellmonolayer (Passage P78/79) keinen Einfluss auf die Permeabilität hatte, was ebenfalls durch Untersuchungen mit Losartan bestätigt wurde (Kapitel 3.1.2.2.).

Die β -Blocker Metoprolol (METO) und Propranolol (PROP), beides Modellsubstanzen für die passive transzelluläre Absorption, zeigten geringfügige Änderungen in der Permeabilität über den Kulturzeitraum von 4 Wochen. Die Permeabilität des lipophileren Propranolols stieg um 7% bei Verwendung von 4 Wochen alten Zellmonolayern im Vergleich zu den Ergebnissen mit 2 Wochen alten Zellmonolayern. Das im Vergleich zum Propranolol hydrophilere Metoprolol zeigte nach 4 Wochen eine Permeabilitätsabnahme um 17% des 2-Wochen-Wertes.

3.1.2.2. Transportstudien mit Losartan und EXP 3174

3.1.2.2.1. Richtungsabhängigkeit des Transportes

An Monolayern von Caco-2-Zellen wurde der Flux von Losartan und EXP 3174 für die apikal-basolateral und basolateral-apikale Transportrichtung untersucht, nachdem Caco-2-Zellen unterschiedlicher Passagen nach jeweils 2 und 3 Wochen in Kultur für die Experimente verwendet wurden.

Aus den Transportuntersuchungen mit den Angiotensin-II-Antagonisten Losartan und EXP 3174 resultierten für beide Caco-2-Zellpassagen (P30/31 und P78/79) signifikant höhere Permeabilitäten beim basolateral-apikalen Transport (b-a), als in apikal-basolateraler Richtung (a-b), wobei die Permeabilitätsunterschiede zwischen den Transportrichtungen beim Losartan höher waren als bei der Carbonsäure EXP 3174 (Tabelle 6).

Tabelle 6: Richtungsabhängigkeit des Transportes von Losartan und EXP 3174 durch Caco-2-Zellmonolayer: Übersicht der mittleren Permeabilitäten von Losartan und EXP 3174 [$\cdot 10^{-6}$ cm/sec] nach Transportstudien (apikal-basolateral und basolateral-apikal) mit verschiedenen Caco-2-Zellpassagen und nach unterschiedlicher Kulturdauer

	Losartan				EXP 3174			
	Passage P30/31		Passage P78/79		Passage P30/31		Passage P78/79	
Wochen in Kultur	2 Wo	3 Wo						
Transport a-b	1,09	1,75	1,45	1,48	0,34	0,56	0,29	0,35
Transport b-a	8,07	9,34	8,19	9,61	1,17	1,66	0,92	0,89
Verhältnis b-a/a-b	7,39	5,32	5,63	6,47	3,47	2,95	3,21	2,57

Die **Losartan**permeabilitäten (a-b und b-a), die aus Transportstudien mit Caco-2-Monolayern älterer Passagen (P78/79) resultierten, waren im allgemeinen höher, als bei Untersuchungen mit jüngeren Passagen (P30/31). Die Kulturdauer der Zellmonolayer hatte bei der älteren Passage (P78/79) keinen signifikanten Einfluss auf die Losartanpermeabilität von apikal nach basolateral, der bei der jüngeren Passage (P30/31) deutlich ausgeprägt war und sich in einer Permeabilitätserhöhung von rund 61% äußerte. Der basolateral-apikale Transport von Losartan stieg bei beiden Passagen mit der Kulturdauer um rund 16% an.

Untersuchungen mit dem aktiven Metaboliten des Losartans **EXP 3174** ergaben nach einer längeren Kulturzeit höhere Permeabilitätswerte für den apikal-basolateralen Transport, sowohl bei der jüngeren als auch bei der älteren Zellpassage (Tabelle 6). Beim Vergleich der Permeabilitätswerte von EXP 3174 nach 2 bzw. 3 Wochen in Kultur fand wiederum bei der jüngeren Caco-2-Zellpassage ein stärkerer Anstieg (67%) statt als bei der älteren (20%). Der basolateral-apikale EXP 3174-Transport ergab bei der jüngeren Zellpassage geringfügig höhere Werte als bei der älteren Passage und zeigte in Abhängigkeit von der Kulturdauer kein einheitliches Verhalten. Bei der Passage P30/31 stieg die Permeabilität nach 3 Wochen in Kultur auf 167%, bei der Passage P78/79 sank sie nach 3 Wochen in Kultur auf 96% der Permeabilität nach 2 Wochen.

3.1.2.2.2. *Effekt von Verapamil auf den Transport von Losartan und EXP 3174*

Der von Saitoh und Aungst (Saitoh 1995) als kompetitiver Inhibitor des ABC-Transporters P-Glykoprotein beschriebene lipophile Calciumkanalblocker Verapamil, wurde in den Transportexperimenten mit Losartan und EXP 3174 in einer Konzentration von 500 μ M zur Hemmung P-GP-vermittelter Transportprozesse eingesetzt (Abbildung 15).

Es konnte in den durchgeführten Studien sowohl für Losartan als auch für den aktiven Metaboliten EXP 3174 eine Beeinflussung der Permeabilität durch Verapamil nachgewiesen werden, die sich in einer starken Abnahme der b-a-Permeabilität bei gleichzeitigem Anstieg des a-b-Transportes äußerte.

In Gegenwart von Verapamil stieg die Permeabilität von **Losartan** beim apikal-basolateralen Transport bei der jüngeren Passage nach 2 Wochen Kulturzeit um 61% und nach 3 Wochen in Kultur um 72%. Transportstudien mit Caco-2-Zellmonolayern der Passage P78/79 ergaben für Losartan nach 2 Wochen Kulturzeit eine a-b-Permeabilitätserhöhung von 34% und nach 3 Wochen von 49%. Für die basolateral-apikale Transportrichtung führte eine P-GP-Hemmung durch Verapamil zu einer Permeabilitätserniedrigung um rund 30% nach 2 Wochen Kulturzeit der P30/31 und um 16% nach 3 Wochen in Kultur. Bei der höheren Passage sank die Permeabilität durch Verapamileinfluss um rund 30% und war unabhängig von der Kulturzeit.

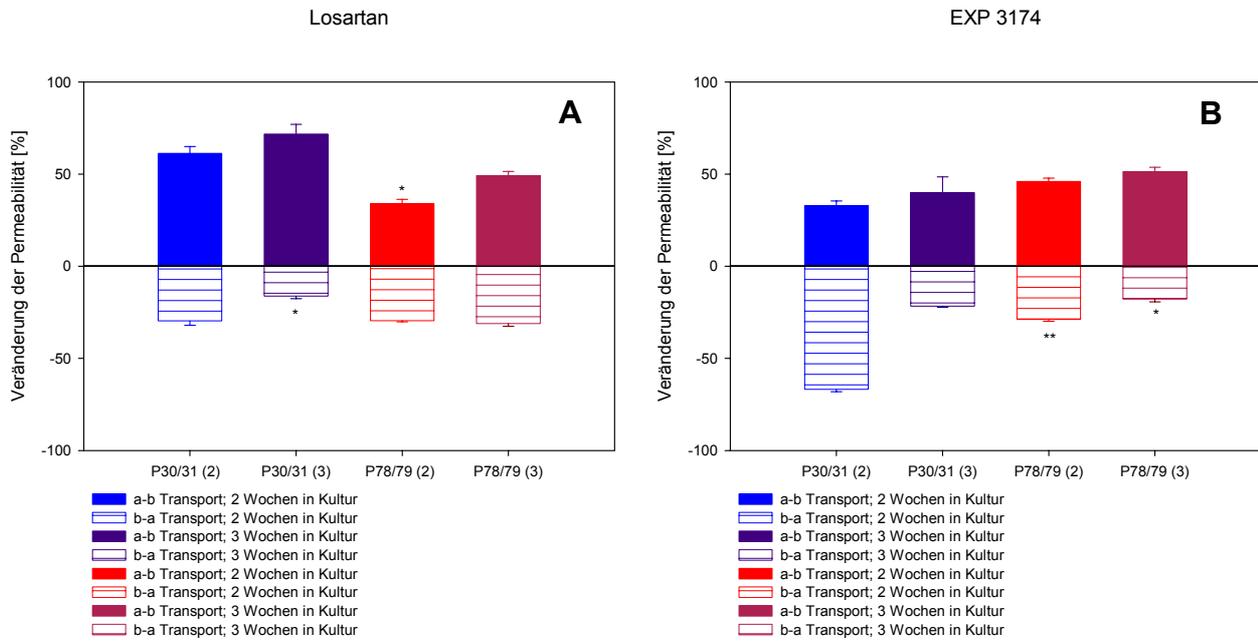


Abbildung 15 A-B: Einfluss von Verapamil auf den Transport von Losartan (A) und EXP 3174 (B) durch Caco-2-Zellmonolayer unterschiedlicher Passagen (P30/31; P78/79); Darstellung der Permeabilitätsveränderung [%] des apikal-basolateralen und basolateral-apikalen Transportweges in Abhängigkeit des Kulturzeitraumes (Mittelwert ± SEM aus n=3 Experimenten, *p<0,05, **p<0,01) im Vergleich zur Kontrolle (= entsprechender Wert ohne Verapamilzusatz)

Im Vergleich zum Losartan hatte Verapamil auf die Permeabilität von **EXP 3174** bei der jüngeren Caco-2-Zellpassage einen nicht so starken Einfluss auf die Erhöhung der Permeabilität, nach 2 Wochen betrug der Anstieg 33% und nach 3 Wochen in Kultur 40%. Geringfügig höher war die Zunahme der Permeabilität von EXP 3174 unter Verapamileinfluss bei der älteren Passage, sie betrug nach 2 Wochen Kulturzeit 46% und nach 3 Wochen in Kultur 51%. Der Transport von basolateral nach apikal sank unter Verapamileinfluss bei beiden Passagen nach 2 Wochen stärker als nach 3 Wochen Kulturzeit. Wurden die Experimente mit Zellen nach 3 Wochen durchgeführt, zeigten sich keine signifikanten Permeabilitätsunterschiede zwischen den Passagen in Bezug auf die Verapamilhemmung.

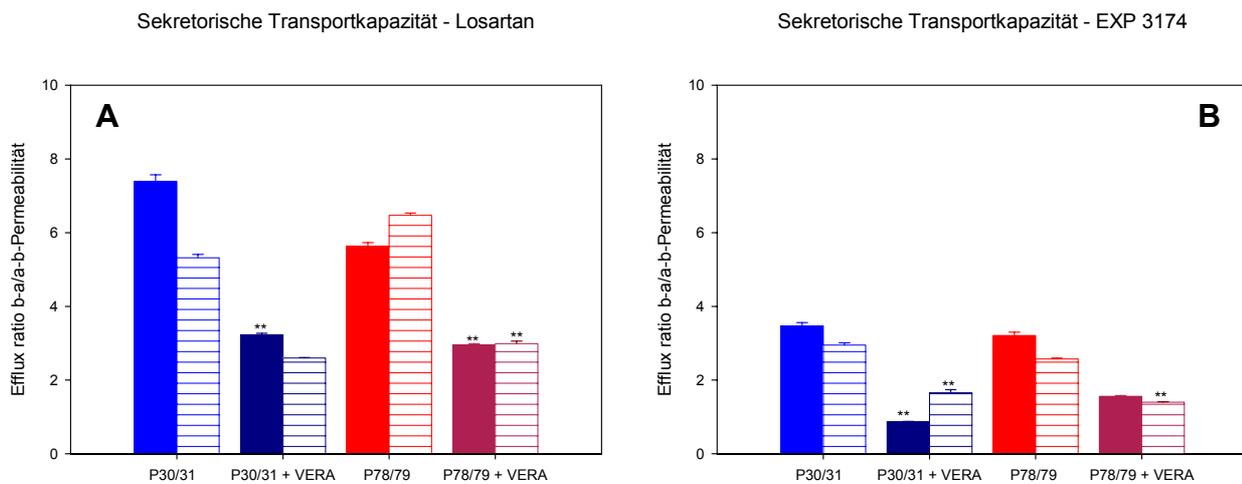


Abbildung 16 A-B: Einfluss der Kulturdauer von Caco-2-Zellmonolayern unterschiedlicher Passagen (P30/31; P78/79) und des P-GP-Inhibitors Verapamil auf das Efflux ratio der Permeabilitäten von Losartan (A) und EXP 3174 (B), (Mittelwert ± SEM aus n=3 Experimenten, *p<0,05, **p<0,01) (Kulturdauer 2 Wochen: ausgefüllte Säulen, Kulturdauer 3 Wochen: gestreifte Säulen)

Zur Abschätzung der sekretorischen Transportkapazität in Caco-2-Zellmonolayern wurde das Efflux ratio aus der Permeabilität des basolateral-apikalen zum apikal-basolateralen Transport gebildet (Abbildung 16). Für die jüngere Caco-2-Zellpassage (P30/31) konnte sowohl für Losartan als auch für EXP 3174 ein deutlicher Einfluss der Kulturperiode gezeigt werden. Vergleicht man die Werte nach 2 und 3 Wochen in Kultur, so zeigte sich nach 3 Wochen Kulturzeit eine deutliche Abnahme des Efflux ratios, die deutlich macht, dass der Verapamileinfluss auf den Transport bei beiden Substanzen nicht mehr so stark ausgeprägt war. Im Falle der älteren Passage (P78/79) konnte die Tendenz für EXP 3174 bestätigt werden, aber nicht in dem Ausmaß wie bei der Passage P30/31. Im Falle des Losartans wurde nach 3 Wochen eine geringe Zunahme des Efflux ratios gefunden, da die Abnahme der b-a-Permeabilität nicht so stark war, wie die Zunahme des apikal-basolateralen Transports.

3.2. In-situ-Perfusionsstudie

3.2.1. Effektive Permeabilität von Losartan und EXP 3174 ohne bzw. bei Anwesenheit von Inhibitoren verschiedener intestinaler Transportsysteme bzw. Inhibitoren von Biotransformationsprozessen

3.2.1.1. Untersuchungen mit Losartan und EXP 3174

Die Resultate der In-situ-Perfusionsstudien mit Losartan und EXP 3174 in Gegenwart von Inhibitoren unterschiedlicher intestinaler Transportsysteme ergaben ein ähnliches Resorptionsverhalten beider Substanzen. Die Permeabilitätswerte des Angiotensin-II-Antagonisten Losartan lagen allerdings in beiden untersuchten Darmabschnitten generell signifikant höher als die des aktiven Metaboliten EXP 3174, wobei die P_{eff} -Werte im Ileum höher waren als diejenigen im Jejunum (Tabelle 7).

Zu Beginn der Untersuchungen wurde getestet, ob eine Coperfusion beider Stoffe möglich ist, oder ob bei einer Coperfusion mit Losartan und EXP 3174 als Cocktail eine Interaktion zu erwarten ist. Dies konnte anhand der Ergebnisse von 2-Stufen-Perfusionen ausgeschlossen werden. Die Permeabilitätswerte von **Losartan** wurden nicht durch Zusatz von **EXP 3174** (CYP3A4- und CYP2C9-Substrat) im Perfusat verändert, ebenso wie ein Losartanzusatz (CYP3A4- und CYP2C9-Substrat) keinen Einfluss auf die intestinale Permeabilität von EXP 3174 hatte (Tabelle 7).

Tabelle 7: Veränderung der intestinalen Permeabilität [$\cdot 10^{-5}$ cm/sec] von Losartan und EXP 3174 bei Coperfusion mit Inhibitoren verschiedener Transportsysteme (Werte in Klammern repräsentieren die Permeabilität der jeweiligen Kontrollgruppe ohne Inhibitorzusatz), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Inhibitor	Konzentration [mM]	Inhibierter Transporter	Losartan		EXP 3174	
			Ileum	Jejunum	Ileum	Jejunum
Losartan	0,01				8,97 (8,68)	7,41 (7,21)
EXP 3174	0,01		14,50 (14,17)	9,61 (9,60)		
Verapamil	0,5	P-GP	17,07 (13,63)	16,47 (12,90)*	8,55 (7,72)	8,36 (7,68)
Vinblastin	0,1	P-GP	31,37 (15,97)**	18,53 (13,60)*	13,03 (9,35)	11,33 (9,90)
Calcein	1	MRP1	24,03 (9,00)**	14,90 (6,61)**	8,73 (5,26)**	8,53 (3,31)**
Indometacin	1	MRP2/cMOAT	21,10 (14,87)**	13,07 (7,13)**	5,14 (4,51)**	4,16 (3,47)*
Probenecid	1	MRP2/cMOAT	19,73 (13,47)	19,47 (8,84)*	8,66 (6,17)*	6,54 (4,55)
Benzoessäure	1	MCT1	9,09 (9,09)	5,71 (5,68)	9,84 (7,92)*	7,85 (5,63)**
Coffein	0,6		8,16 (9,38)**	5,26 (6,47)**	3,66 (6,00)	2,98 (4,36)*
Taurin	32	Taurin-TP	9,26 (9,25)	6,11 (6,39)	6,22 (6,39)	4,45 (4,66)

In den Perfusionsuntersuchungen wurde durch Beeinflussung unterschiedlicher Transportsysteme getestet, welche Transporter im Absorptions- und Sekretionsgeschehen von Losartan und EXP 3174 eine Rolle spielen (Abbildung 17).

Durch Zusatz von **Verapamil** (0,5 mM) bzw. **Vinblastin** (0,1 mM), Hemmern des ABC-Transporters P-GP und gleichzeitig Cytochrom-3A4-Inhibitoren, im Perfusat wurde ein Anstieg der Permeabilitäten von Losartan und EXP 3174 erreicht, wobei das Ausmaß beim Losartan um den Faktor 2 im Vergleich zum EXP 3174 erhöht war. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch Zusatz von Vinblastin eine höhere Permeabilitätszunahme erreicht wurde als durch Verapamil. Bei Losartan stieg die intestinale Permeabilität nach Vinblastinzusatz um 96% im Ileum und 40% im Jejunum, nach Verapamil-Coperfusion wurden hingegen nur Zunahmen von 26% im Ileum und 28% im Jejunum erreicht. Im Falle des Metaboliten EXP 3174 wurden bei Coperfusion mit Vinblastin Permeabilitätsanstiege von 44% im Ileum und 17% im Jejunum gefunden. Unter Verapamilzusatz stieg die Permeabilität im Ileum um 10% und im Jejunum um 14%.

Wurde der Perfusatlösung **Calcein** (1mM), ein MRP1-Inhibitor, zugesetzt, konnte sowohl bei Losartan als auch bei EXP 3174 ein Anstieg der effektiven Permeabilität beobachtet werden. Im Ileum stieg die Permeabilität bei Losartan um 180% und bei EXP 3174 um 80%. Eine Permeabilitätszunahme von 128% bei Losartan und 203% bei EXP 3174 wurde im Jejunum gefunden.

Ein Zusatz von **Benzoessäure** (1 mM), ein MCT1-Hemmer, im Perfusat führte im Falle des Losartans zu keiner Veränderung der intestinalen Permeabilität. Bei der Carbonsäure EXP 3174 hingegen wurde eine Zunahme nachgewiesen, die im Ileum 24% und im Jejunum 39% betrug.

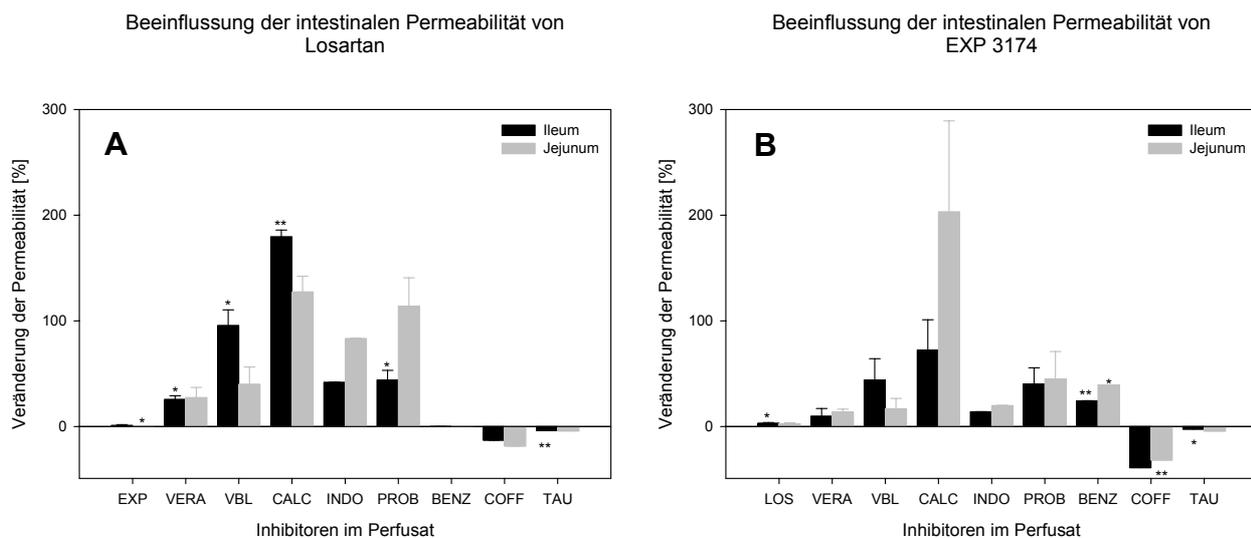


Abbildung 17: Prozentuale Veränderung der intestinalen Permeabilität von Losartan (A) und EXP 3174 (B) bei Coperfusion mit Inhibitoren verschiedener intestinaler Transportsysteme (Mittelwert \pm SEM aus $n=3$ Experimenten, * $p<0,05$, ** $p<0,01$):

Hemmung von P-GP durch Verapamil (VERA), Vinblastin (VBL);
 MRP1 durch Calcein (CALC);
 MRP2/cMOAT durch Indometacin (INDO), Probenecid (PROB);
 MCT1 durch Benzoessäure (BENZ) und
 Hemmung durch Coffein (COFF) und Taurin (TAU)

Ebenso führte ein Zusatz von **Taurin** (32 mM), das über den Taurintransporter intestinal transportiert wird, zu keiner gravierenden P_{eff} -Veränderung. Sowohl der Losartan- als auch der EXP 3174-Transport sank um weniger als 5% in beiden Darmabschnitten. Der Zusatz des Xanthin-Derivates und CYP1A2-Substrates **Coffein** (0,6 mM) hingegen führte zu einer signifikanten Permeabilitätsabnahme bei beiden

Substanzen, die aber beim EXP 3174 ausgeprägter war als beim Losartan. Sie betrug für Losartan 13% im Ileum und 19% im Jejunum, im Falle des EXP 3174 sank die ileale Permeabilität um 39% und die jejunale um 32%.

Die MRP2/cMOAT-Inhibitoren **Indometacin** (1 mM, CYP2C9-Substrat) und **Probenecid** (1 mM, Hemmer der Glucuronidierung von Säuren) führten sowohl beim Losartan als auch beim EXP 3174 zu einem Anstieg der Permeabilität. Unter Einfluss von Indometacin stieg die effektive Permeabilität für Losartan im Ileum um 42% und für EXP 3174 um 14%. Die jejunale Permeabilität stieg um 84% bei Losartan und um 20% bei EXP 3174. Bei gleichzeitiger Perfusion mit Probenecid stieg im Jejunum die Permeabilität von Losartan um 44% und bei EXP 3174 um 40%. Im Ileum zeigte sich ein ähnliches Bild wie unter Indometacineinfluss, beim Losartan führte eine Coperfusion zu einer Zunahme von 114% und bei EXP 3174 um 45%.

3.2.2. Beeinflusst die Tageszeit den intestinalen Substanztransport?

Die Lebensfunktionen aller Lebewesen unterliegen der Beeinflussung durch die Zeit, so dass sich im Laufe der Evolution biologische Rhythmen (zirkadian, -annual) herausbilden konnten, die auf zwei verschiedene Arten zustande kommen konnten. Entweder wurden sie direkt durch äußere Umweltrhythmen (z.B. Tag-Nachtwechsel), also exogene Biorhythmen, oder durch innere Oszillatoren (z.B. Körpertemperatur, Schlaf-Wachzyklus) gesteuert. Die letzteren, die endogenen Rhythmen, blieben auch bestehen wenn der äußere Zeitgeber, wie z.B. das Tageslicht, wegfiel. Die meisten tierexperimentellen Untersuchungen wurden häufig an Nagetieren vorgenommen, die im Gegensatz zum tagaktiven Menschen nachtaktive Lebewesen sind, so dass fast alle gefundenen Rhythmen im Vergleich zum Mensch phaseninvers ablaufen und ohne Beachtung der Aktivitätsphasen nur bedingt übertragbar sind.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen über die Zeitabhängigkeit der Zytostatika-Toxizität (Chronotoxizität) im Tierversuch durchgeführt (Hallek 1990) und gefunden, dass sowohl die Toxizität als auch der Therapieerfolg tageszeitlichen Rhythmen unterliegen (Zeller 1998).

Anhand dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob auch die Aktivität verschiedener Transporter (z.B. P-GP) an dieser Rhythmik beteiligt sein könnten, so dass mit dem P-GP-Modellsubstrat Talinolol und mit dem Angiotensin-II-Antagonisten Losartan Perfusionsstudien zu verschiedenen Tageszeiten durchgeführt wurden.

3.2.2.1. Perfusionen mit dem P-GP-Modellsubstrat Talinolol und dem Angiotensin-II-Antagonisten Losartan

Die intestinalen P_{eff} -Werte für Losartan und Talinolol wurden in einer 3-Stufen-Perfusion über einen Gesamtzeitraum von 165 Minuten (inklusive der Vorlaufzeiten) ermittelt. In der ersten Periode (40 Minuten, davon 30 Minuten Beobachtungsperiode) wurde die Permeabilität von Losartan bzw. Talinolol ohne weiteren Zusatz von Inhibitoren ermittelt. In der zweiten und dritten Perfusionsperiode (40 Minuten, davon 30 Minuten Beobachtungsperiode) wurden dem Perfusat verschiedene Hemmer der intestinalen Sekretion zugesetzt und deren Einfluss auf die Permeabilität von Losartan und Talinolol untersucht. Die Versuche waren so angelegt, dass zwischen den Versuchszeiträumen jeweils eine Zeitdifferenz von 12 Stunden lag.

Sowohl für das P-GP-Modellsubstrat Talinolol als auch für Losartan konnten deutliche Permeabilitätsunterschiede zwischen Tag- und Nacht-Perfusionen gefunden werden, die sich bei beiden Substanzen in einer Senkung der intestinalen Permeabilität (Tabelle 8) in der Nacht äußerten. Für den Angiotensin-II-Antagonisten Losartan betrug die nächtliche Abnahme der Permeabilität 41% im Jejunum und 23% im Ileum. Talinolol hingegen zeigt nicht so deutliche Unterschiede innerhalb der Darmabschnitte, hier lag die nächtliche Reduktion der Permeabilität bei 28% im Jejunum und 32% im Ileum.

Tabelle 8: Tageszeitliche Unterschiede und prozentuale Veränderung der intestinalen Permeabilitäten [$\cdot 10^{-5}$ cm/sec] von Losartan und Talinolol nach In-situ-Perfusionen (n=3 Ratten) mit verschiedenen P-GP-Inhibitoren (Talinolol (0,01 mM); Losartan (0,01 mM), Rifampicin (0,05 mM), PSC 833 (0,02 mM), Vinblastin (0,01 mM); Losartan (0,01 mM): Verapamil (0,5 mM), EXP 3174 (0,01 mM), PSC 833 (0,02 mM), Vinblastin (0,01 mM), *p<0,05, **p<0,01

	Jejunum				Ileum			
	Tag	% Inhib.	Nacht	% Inhib.	Tag	% Inhib.	Nacht	% Inhib.
Talinolol	20,33 ± 0,46		14,59** ± 0,13		20,89 ± 0,33		14,26** ± 0,19	
Talinolol + Losartan	24,12 ± 0,40	+ 18,65	21,26** ± 0,22	+ 45,66	-		-	
Talinolol + Rifampicin	23,51 ± 0,22	+ 15,69	18,34 ± 0,08	+ 25,65	-		-	
Talinolol + PSC 833	-		-		27,21 ± 0,33	+ 30,25	23,73** ± 0,15	+ 66,36
Talinolol + Vinblastin	23,02 ± 0,76	+ 13,25	19,21* ± 0,58	+ 31,61	26,40 ± 0,92	+ 26,36	22,56* ± 1,11	+ 58,13
Losartan	6,11 ± 0,20		3,60** ± 0,26		10,69 ± 0,39		8,18* ± 0,64	
Losartan + EXP 3174	5,74 ± 0,78	- 5,98	3,43* ± 0,25	- 4,73	10,35 ± 0,23	- 3,11	8,36** ± 0,18	+ 2,20
Losartan + Verapamil	11,49 ± 0,59	+ 88,05	8,65* ± 0,60	+ 140,45	17,88 ± 2,36	+ 67,31	12,53 ± 0,60	+ 53,27
Losartan + PSC 833	16,97 ± 0,32	+ 177,83	15,22* ± 0,32	+ 323,24	22,15 ± 1,51	+ 107,34	21,82 ± 0,34	+ 166,86
Losartan + Vinblastin	11,40 ± 0,26	+ 86,63	9,10** ± 0,19	+ 152,99	16,79 ± 1,05	+ 57,18	14,24* ± 0,22	+ 74,11

Da innerhalb der hier betrachteten Darmabschnitte (Ileum und Jejunum) bereits in früheren Untersuchungen (Hanafy 2001) gezeigt wurde, dass für das Modellsubstrat **Talinolol** keine signifikanten Unterschiede zwischen Ileum und Jejunum auftraten, wurde nicht jeder Hemmer an jedem Darmabschnitt separat getestet. Es konnte gezeigt werden, dass ohne weiteren Zusatz die tageszeitlichen Schwankungen am ausgeprägtesten waren. Wurde dem Perfusat zusätzlich noch Rifampicin zugesetzt, betrug die Abnahme der Talinololpermeabilität in der Nacht im Mittel 22% im Vergleich zum Tag. Bei einem Zusatz von Vinblastin nahm die intestinale Permeabilität von Talinolol im Mittel 16% ab (Abbildung 18), bei Losartan 12% und bei PSC 833 13%. Betrachtet man nun aber die Veränderung der Permeabilität bei Zusatz von verschiedenen Sekretionshemmern, so ist unter PSC 833 der Einfluss am größten. Am Tage nahm die Talinololpermeabilität bei Coperfusion mit PSC 833 um 30% zu, in der Nacht um 66%. Im Falle einer Rifampicin-Coperfusion war die Zunahme am geringsten und stieg von 16% am Tag auf 26% in der Nacht.

Bei Untersuchungen mit **Losartan** zeigte sich ebenfalls, dass die Tag-Nacht-Unterschiede ohne Zusatz von Inhibitoren am höchsten waren, im Jejunum sank die Permeabilität in der Nacht um 42% und im Ileum um 23%. Generell wurden aber im Ileum höhere Permeabilitätswerte für Losartan gemessen, wobei das Ausmaß der Veränderung vom Tag zur Nacht im Jejunum deutlicher ausgeprägt war.

Sehr deutlich waren die tageszeitlichen Unterschiede in der Permeabilität bei Zusatz von PSC 833 im Perfusat zu sehen. In diesem Falle stiegen die Werte bei PSC 833-Zusatz von 178% auf 323% im Jejunum und von 107% auf 167% im Ileum an.

Der aktive Metabolit des Losartans EXP 3174 hatte bei gleichzeitiger Perfusion nur einen sehr geringen Einfluss auf die Permeabilität der Muttersubstanz. Bei Coperfusion kam es zu einer Verringerung der intestinalen Permeabilität, die im Jejunum 6% und im Ileum 3% am Tage betrug. In der Nacht lagen die Werte bei 5% im Jejunum und 2% im Ileum.

Für die beiden P-GP-Substrate Verapamil und Vinblastin konnte ebenfalls ein signifikanter tageszeitlicher Permeabilitätsunterschied detektiert werden, der für beide Substanzen in der gleichen Größenordnung lag. Bei Verapamil-Coperfusion war die P_{eff} -Zunahme am Tag geringfügig höher als bei Vinblastin-Coperfusion. In der Nacht dagegen hatte Vinblastin einen stärkeren Einfluss auf die P-GP-Hemmung als Verapamil. Ebenso war der tageszeitliche Unterschied bei Vinblastin (Abbildung 18) stärker ausgeprägt als beim Verapamil.

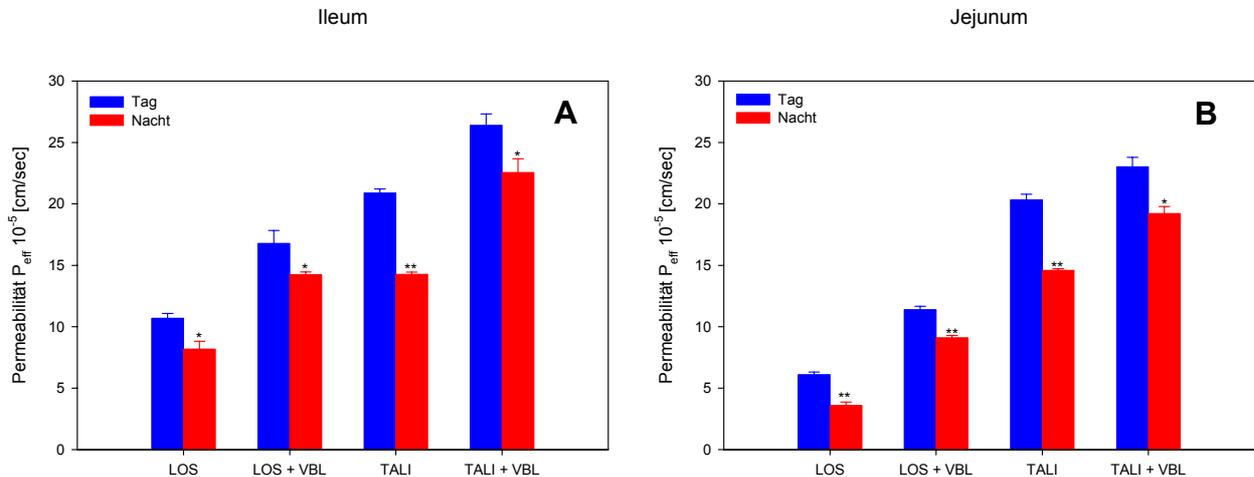


Abbildung 18 A-B: Einfluss der Tageszeit auf die effektiven intestinalen Permeabilitäten [$\cdot 10^{-5}$ cm/sec] von Losartan und Talinolol mit und ohne Zusatz von Vinblastin als P-GP-Inhibitor (Mittelwert \pm SEM für $n=2$ Ratten) im Ileum (A) und Jejunum (B), * $p<0,05$, ** $p<0,01$

3.3. In-vivo-Untersuchungen

3.3.1. Pharmakokinetische Studien in vivo an der Ratte

Zur Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter von Losartan und seinem aktiven Metaboliten EXP 3174 (z.B. Clearance, biliäre Ausscheidung und Bioverfügbarkeit) wurden an Sprague-Dawley-Ratten In-vivo-Studien durchgeführt. Das Versuchsdesign (siehe Kapitel 5.3.2.1) umfasste eine intravenöse sowie eine perorale Applikation von Losartan bzw. von EXP 3174, wobei der Hälfte der Versuchstiere vor der Studie der Gallengang permanent kanüliert worden war. Die produzierte Gallenflüssigkeit wurde in definierten Intervallen gesammelt, die einzelnen Fraktionen gewogen und so das pro Zeitintervall produzierte Gallenvolumen bestimmt. Aus diesen Daten konnte dann anhand der Konzentrationen die insgesamt biliär ausgeschiedene Menge an Losartan und EXP 3174 berechnet werden. Den Blutproben wurde Heparin als Gerinnungshemmer zugesetzt. Die Gallenproben wurden nicht stabilisiert, sie wurden nach der Abnahme im Eisbad gekühlt.

Die Bestimmung der Losartan- und EXP 3174-Konzentration in den Proben aus den In-vivo-Kinetikstudien erfolgte durch Reversed-phase-HPLC mit Fluoreszenzdetektion. Die Methodvalidierung hatte für beide Substanzen eine gute Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenzen von 10 ng/100 μ l für Losartan und EXP 3174 ergeben.

Die nichtkompartimentelle pharmakokinetische Auswertung der Konzentrations-Zeit-Profile des Angiotensin-II-Antagonisten Losartan und seines aktiven Metaboliten EXP 3174 wurde mit dem Programm TopFit 2.0 (Heinzel 1993) durchgeführt.

3.3.1.1. Pharmakokinetische Parameter nach intravenöser Applikation von Losartan bzw. EXP 3174**3.3.1.1.1. Kinetische Analyse der Konzentrations-Zeit-Profile****Applikation von Losartan:**

Die Konzentrations-Zeit-Profile nach intravenöser Applikation (Abbildung 19) von 3 mg/kg KG Losartan pro Ratte zeigten einen biphasischen Verlauf. Bei der Mehrheit der Kurven trat nach etwa 8 Stunden ein zusätzliches Maximum für Losartan auf, das sowohl bei den kanülierten als auch bei den nichtkanülierten Versuchstieren zu finden war. Das Konzentrations-Zeit-Profil des aktiven Metaboliten EXP 3174 zeigte nach Losartanapplikation bei beiden Kollektiven nach rund 5 Stunden ein Minimum, um dann wieder anzusteigen und ab etwa 13 Stunden einen nahezu konstanten Wert anzunehmen.

Bei Analyse der mittleren Konzentrations-Zeit-Profile des Gesamtkollektives ergab die Berechnung eine terminale Halbwertszeit von 530 Minuten für Losartan und von 1001 Minuten für EXP 3174. Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve betrug bei dieser Applikationsart 3323 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$ für Losartan und lag damit etwas höher als bei EXP 3174, dessen Fläche 3067 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$ betrug. Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Auswertung (Tabelle 9) nach intravenöser und peroraler Applikation wurden für eine Abschätzung der absoluten Bioverfügbarkeit für die perorale Gabe herangezogen. Für Losartan wurde auf diese Weise eine mittlere absolute Bioverfügbarkeit von 33% ermittelt.

Wurden die i.v.-Daten für die beiden Untergruppen der Versuchstiere separat, d.h. unter Berücksichtigung der Kanülierung des Gallengangs der Versuchstiere, analysiert, so ergab sich für die Gruppe der Gallengangs-kanülierten Ratten bei Losartan eine terminale Halbwertszeit von 695 Minuten, bei nichtkanülierten Tieren eine von 364 Minuten. Im Falle des Losartanmetaboliten EXP 3174 lag die terminale Halbwertszeit bei kanülierten Ratten bei 806 Minuten und bei Ratten ohne Gallengangskatheter bei 1130 Minuten. Die totale Clearance lag mit 2,8 ml/min für Losartan bei nichtkanülierten Ratten deutlich höher als mit 0,6 ml/min für das kanülierte Kollektiv. Die AUC betrug für Losartan 5328 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$ bei kanülierten und 1318 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$ bei nichtkanülierten Versuchstieren. Beim aktiven Metaboliten EXP 3174 wurde bei kanülierten Ratten eine AUC von 5001 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$, bei nichtkanülierten Ratten eine von 1777 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$ gefunden. Die abgeschätzte mittlere absolute Bioverfügbarkeit nach peroraler Gabe betrug bei kanülierten Ratten 44% und bei nichtkanülierten Ratten 21%.

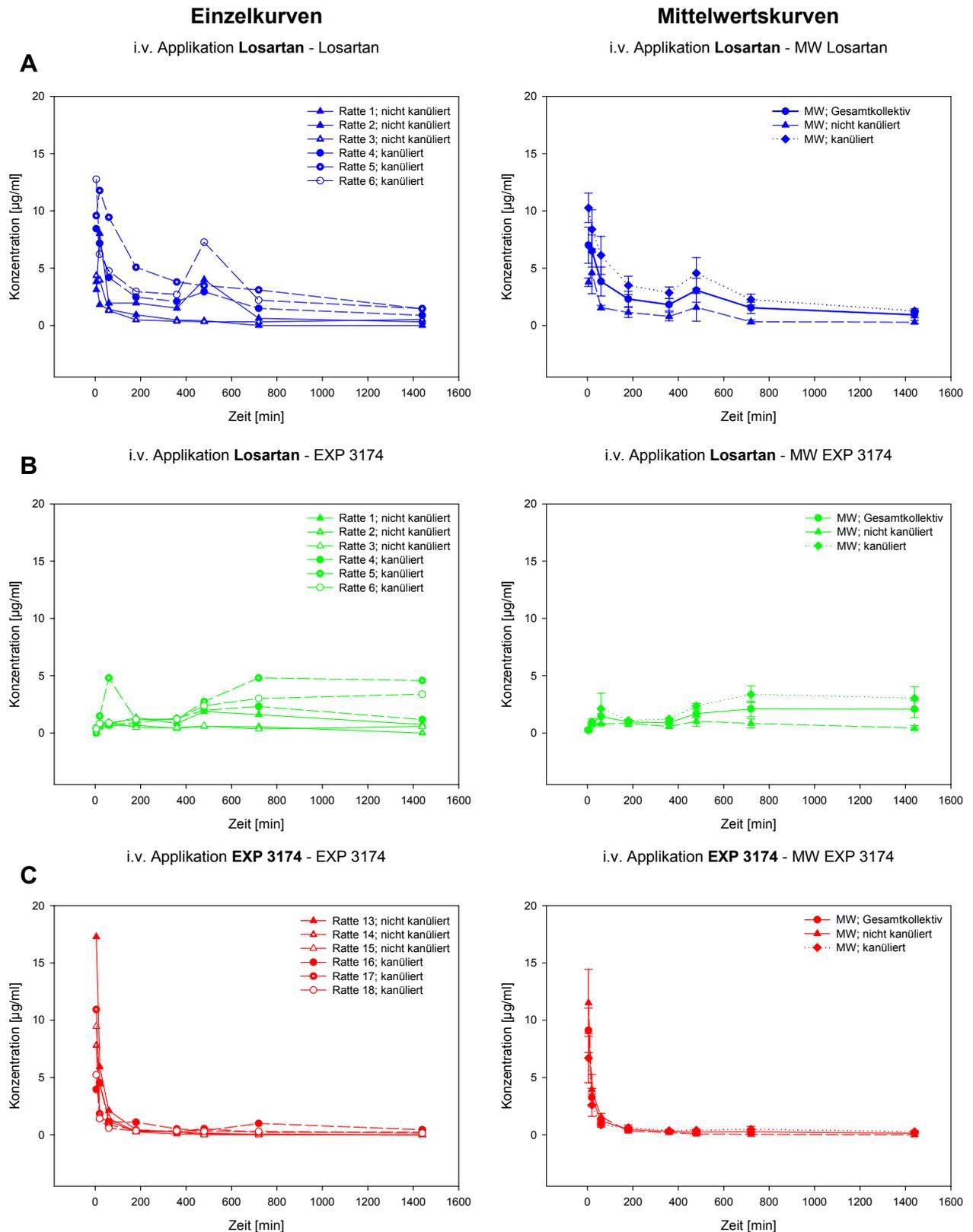


Abbildung 19 A-C: Individuelle und mittlere Blutkonzentrations-Zeit-Profile (Mittelwerte \pm SEM) nach intravenöser Applikation von Losartan bzw. von EXP 3174 [3 mg/kg KG]: Nichtkanülierte vs. Gallengangs-kanülierte Ratten (n=3 pro Gruppe) ($M_{G_{\text{Losartan}}}$ 422,9 g/mol, $M_{G_{\text{EXP 3174}}}$ 437,9 g/mol)

A: Blutkonzentrations-Zeit-Profile für Losartan nach Applikation von Losartan (blaue Kurven)

B: Blutkonzentrations-Zeit-Profile für EXP 3174 nach Applikation von Losartan (grüne Kurven)

C: Blutkonzentrations-Zeit-Profile für EXP 3174 nach Applikation von EXP 3174 (rote Kurven)

Applikation von EXP 3174:

Bei logarithmischer Darstellung der Konzentrations-Zeit-Profile (Abbildung 19), die nach intravenöser Applikation von 3 mg/kg KG EXP 3174 pro Ratte erhalten wurden, zeigten die Kurven ebenfalls einen typischen biphasischen Verlauf. Im Vergleich zur Losartanapplikation wurde aber über den gesamten Zeitraum kein zweites Maximum beobachtet.

Die Berechnung der Mittelwerte aus den individuellen pharmakokinetischen Parametern des Gesamtkollektives (Tabelle 9) ergab nach EXP 3174-Applikation eine mittlere terminale Halbwertszeit von 203 Minuten und eine AUC von 616 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$. Unter Einbeziehung aller Daten konnte für EXP 3174 nach peroraler Gabe eine mittlere absolute Bioverfügbarkeit von 19% abgeschätzt werden.

Bei Berücksichtigung der Gallengangskanülierung der Ratten in der Berechnung der Parameter ergaben sich für die kanülierten Ratten eine terminale Halbwertszeit von 254 Minuten, und bei den nichtkanülierten Ratten betrug sie 153 Minuten, wobei die totale Clearance der nichtkanülierten Ratten dann aber höhere Werte (7 ml/min) annahm als bei den kanülierten Ratten (4,7 ml/min). Die AUC betrug für die Gruppe der kanülierten Ratten 760 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$, 471 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$ bei nichtkanülierten Versuchstieren. Auch wurde bei kanülierten Ratten eine höhere mittlere absolute Bioverfügbarkeit von 21% und im Vergleich dazu 17% bei nichtkanülierten Versuchstieren gefunden.

Tabelle 9: Übersicht kinetischer Parameter nach nichtkompartimenteller Analyse der Blutdaten nach intravenöser Losartan- bzw. EXP 3174-Applikation (Mittelwerte \pm SEM für n=3 bzw. n=6 Ratten)

intravenöse Applikation	Messung von:	Pharmakokinetische Parameter:					
		$t_{1/2}$ [min]	λ [min^{-1}]	CL_{tot} [ml/min]	V_D [l]	$\text{AUC}_{0-\infty}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$]	F [%]
Nicht kanülierte Ratten (n=3)							
Losartan	Losartan	364 ± 68	$2,05\cdot 10^{-3}$ $\pm 0,40\cdot 10^{-3}$	2,80 $\pm 0,74$	1,35 $\pm 0,30$	1318 ± 470	21 ± 8
	EXP 3174	1130 ± 266	$0,69\cdot 10^{-3}$ $\pm 0,17\cdot 10^{-3}$	-	-	1777 ± 415	-
EXP 3174	EXP 3174	153 ± 3	$4,54\cdot 10^{-3}$ $\pm 0,09\cdot 10^{-3}$	7,02 $\pm 1,55$	1,56 $\pm 0,38$	471 ± 101	17 ± 3
Kanülierte Ratten (n=3)							
Losartan	Losartan	695 ± 60	$1,01\cdot 10^{-3}$ $\pm 0,08\cdot 10^{-3}$	0,60 $\pm 0,11$	0,60 $\pm 0,11$	5328 ± 816	44 ± 3
	EXP 3174	806 ± 233	$0,98\cdot 10^{-3}$ $\pm 0,28\cdot 10^{-3}$	-	-	5001 ± 643	-
EXP 3174	EXP 3174	254 ± 69	$3,17\cdot 10^{-3}$ $\pm 0,83\cdot 10^{-3}$	4,68 $\pm 1,14$	1,77 $\pm 0,77$	760 ± 244	21 ± 6
Gesamtkollektiv (n=6)							
Losartan	Losartan	530 ± 84	$1,53\cdot 10^{-3}$ $\pm 0,29\cdot 10^{-3}$	1,70 $\pm 0,60$	0,98 $\pm 0,22$	3323,10 $\pm 990,54$	33 ± 6
	EXP 3174	1001 ± 172	$0,81\cdot 10^{-3}$ $\pm 0,15\cdot 10^{-3}$	-	-	3067 ± 784	-
EXP 3174	EXP 3174	203 ± 38	$3,85\cdot 10^{-3}$ $\pm 0,48\cdot 10^{-3}$	5,85 $\pm 1,01$	1,67 $\pm 0,39$	616 ± 135	19 ± 3

3.3.1.1.2. Bestimmung in der Gallenflüssigkeit**Applikation von Losartan:**

Im Rahmen der kinetischen Untersuchungen mit i.v. und p.o. appliziertem Losartan bzw. EXP 3174 wurde auch Galle über einen Zeitraum von 26 Stunden fraktioniert gesammelt (Kapitel 5.3.2.1.) und hinsichtlich Losartan und EXP 3174 durch HPLC analysiert (Abbildung 21).

Nach pharmakokinetischer Auswertung (Tabelle 10) der für die Gallenflüssigkeit ermittelten Ausscheidungsgeschwindigkeiten, die anhand der „rate“-Methode nach Applikation einer intravenösen Dosis von 3 mg/kg KG durchgeführt wurden, ergab sich eine terminale Halbwertszeit von 404 Minuten für Losartan und von 382 Minuten für den Metaboliten. Über den gesamten Sammelzeitraum wurden 50,9 µg Losartan und 44 µg EXP 3174 bei einem durchschnittlichen Gallefluss von 2,1 µl/min ausgeschieden. Dies entspricht einer biliären Ausscheidung von 6% der Dosis als unverändertes Losartan und 4% der Dosis als EXP 3174 innerhalb von 26 Stunden.

Applikation von EXP 3174:

Nach intravenöser Applikation von EXP 3174 und pharmakokinetischer Auswertung (Tabelle 10) der für die Gallenflüssigkeit ermittelten Ausscheidungsgeschwindigkeiten konnte anhand der „rate“-Methode eine terminale Halbwertszeit für EXP 3174 von 284 Minuten ermittelt werden. Über den gesamten Sammelzeitraum wurden 318 µg EXP 3174 mit einem durchschnittlichen Gallefluss von 6,1 µl/min ausgeschieden. Das entspricht einer biliären Ausscheidung von 35% der Dosis unverändertem EXP 3174 innerhalb von 26 Stunden.

Tabelle 10: Galledaten (kumulative Ausscheidung) nach intravenöser Losartan- bzw. EXP 3174-Applikation: Übersicht kinetischer Parameter nach nichtkompartimenteller Analyse (Mittelwerte ± SEM für n=3 Ratten)

Pharmakokinetische Parameter:	Applikation von:		
	Losartan	EXP 3174	EXP 3174
Dosis 3 mg/kg KG [mg/Tier]	0,91 ± 0,02	-	0,91 ± 0,02
t _{1/2} [h]	404,38 ± 6,29	382,32 ± 11,08	283,79 ± 20,99
λ [min ⁻¹]	1,71·10 ⁻³ ± 2,64·10 ⁻⁵	1,82·10 ⁻³ ± 5,41·10 ⁻⁵	6,01·10 ⁻³ ± 1,94·10 ⁻³
Ausgeschiedene Menge Ae _{0-26h} [µg]	50,87 ± 28,08	44,00 ± 3,18	318,00 ± 54,90
Mittlerer Gallefluss [µl/min]	2,14 ± 0,10	-	6,12 ± 0,95

3.3.1.2. Pharmakokinetische Parameter nach peroraler Applikation von Losartan bzw. EXP 3174

3.3.1.2.1. Kinetische Analyse der Konzentrations-Zeit-Profile

Applikation von Losartan:

Die Auswertung der Konzentrations-Zeit-Profile nach peroraler Gabe (Abbildung 20) von Losartan ergab maximale Blutspiegel für Losartan nach 20 Minuten, und für den aktiven Metaboliten wurde ein mittlerer C_{max}-Wert von 163 Minuten gemessen. Die kinetische Analyse der individuellen Konzentrations-Zeit-Profile ergaben für das Gesamtkollektiv eine mittlere terminale Halbwertszeit von 537 Minuten bei Losartan und von 565 Minuten bei EXP 3174. Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, die nach der Trapezregel bestimmt wurde, betrug für Losartan 2617 µg·ml⁻¹·min und für den aktiven Metaboliten 1719 µg·ml⁻¹·min.

Wurde bei der kinetischen Auswertung (Tabelle 11) der Daten die Kanülierung des Gallenganges der Ratten in Betracht gezogen, so ergaben sich abweichende Werte für die beiden Kollektive, denen jeweils 3 Ratten angehörten. Für Losartan lagen die maximalen Blutkonzentrationen bei 20 Minuten. Eine Sammlung der Galle hatte keinen Einfluss auf das zeitliche Auftreten des Maximums (t_{max}), aber auf die Maximalkonzentration C_{max}. Nach Gallengangskanülierung traten C_{max}-Werte von 8,5 µg/ml auf, ohne Gallengangskanülierung lagen die Maxima mit 4,6 µg/ml dagegen niedriger. Bei Auswertung der Konzentrations-Zeit-Profile, die nach Losartanapplikation bei kanülierten Ratten gemessen wurden, ergaben sich für Losartan mittlere Halbwertszeiten von 496 Minuten. Die Werte für den aktiven

Metaboliten EXP 3174 lagen bei 529 Minuten. Nach peroraler Verabreichung von Losartan an Gallengangs-kanülierte Ratten wurden maximale EXP 3174-Blutkonzentrationen von 2,6 µg/ml 127 Minuten nach Applikation gemessen. War der Gallengang der Ratten dagegen nicht kanüliert, so traten maximale EXP 3174-Blutkonzentrationen erst nach 200 Minuten mit mittleren C_{max} -Werten von 2,4 µg/ml auf. Für die nichtkanülierten Versuchstiere wurden mittlere Losartanhalbwertszeiten von 579 Minuten bestimmt, die Halbwertszeit des EXP 3174 betrug 602 Minuten. Hinsichtlich der oralen Clearance zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie nach intravenöser Gabe. Die Werte der nichtkanülierten Ratten lagen für die Muttersubstanz Losartan mit 77,1 ml/min deutlich über denen der kanülierten Ratten, bei denen nur Werte von 29,5 ml/min zu finden waren. Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) betrug für die Muttersubstanz Losartan 3617 µg·ml⁻¹·min bei Gallengangs-kanülierten Ratten und 1617 µg·ml⁻¹·min bei nichtkanülierten. Die AUC des Metaboliten EXP 3174 lag bei kanülierten Ratten bei 1774 µg·ml⁻¹·min, bei nichtkanülierten Versuchstieren ergab sich ein Wert von 1664 µg·ml⁻¹·min.

Tabelle 11: Übersicht kinetischer Parameter nach nichtkompartimenteller Analyse der Blutdaten nach peroraler Losartan- bzw. EXP 3174-Applikation (Mittelwerte ± SEM für n=3 bzw. n=6 Ratten)

perorale Applikation von:	Messung von:	Pharmakokinetische Parameter:						
		C_{max} [µg/ml]	t_{max} [min]	$t_{1/2}$ [min]	λ [min ⁻¹]	CL/F [ml/min]	V_D [l]	$AUC_{0-\infty}$ [µg·ml ⁻¹ ·min]
Nicht kanülierte Ratten (n=3)								
Losartan	Losartan	4,56 ± 1,97	20 ± 0	579,34 ± 61,77	$1,23 \cdot 10^{-3}$ ± $0,13 \cdot 10^{-3}$	77,08 ± 25,59	6,98 ± 2,95	1617,11 ± 532,01
	EXP 3174	2,40 ± 1,60	200 ± 87,18	601,65 ± 176,55	$1,33 \cdot 10^{-3}$ ± $0,31 \cdot 10^{-3}$	-	-	1664,47 ± 634,48
EXP 3174	EXP 3174	0,25 ± 0,03	20 ± 0	348,23 ± 62,47	$2,16 \cdot 10^{-3}$ ± $0,47 \cdot 10^{-3}$	247,14 ± 62,55	21,70 ± 6,38	267,95 ± 90,49
Kanülierte Ratten (n=3)								
Losartan	Losartan	8,49 ± 1,44	20 ± 0	495,57 ± 55,18	$1,43 \cdot 10^{-3}$ ± $0,15 \cdot 10^{-3}$	29,50 ± 6,13	2,11 ± 0,41	3617,18 ± 638,26
	EXP 3174	2,55 ± 0,88	126,67 ± 53,33	528,90 ± 29,97	$1,32 \cdot 10^{-3}$ ± $0,07 \cdot 10^{-3}$	-	-	1774,39 ± 884,23
EXP 3174	EXP 3174	0,56 ± 0,15	33,33 ± 13,33	706,90 ± 339,71	$1,43 \cdot 10^{-3}$ ± $0,46 \cdot 10^{-3}$	141,59 ± 13,13	24,37 ± 9,65	394,52 ± 36,35
Gesamtkollektiv (n=6)								
Losartan	Losartan	6,52 ± 1,40	20 ± 0	537,46 ± 41,51	$1,33 \cdot 10^{-3}$ ± $0,10 \cdot 10^{-3}$	53,29 ± 15,86	4,55 ± 1,72	2617,15 ± 581,46
	EXP 3174	2,47 ± 0,82	163,33 ± 48,56	565,28 ± 81,72	$1,32 \cdot 10^{-3}$ ± $0,14 \cdot 10^{-3}$	-	-	1719,43 ± 487,33
EXP 3174	EXP 3174	0,40 ± 0,10	26,67 ± 6,67	527,57 ± 174,05	$1,79 \cdot 10^{-3}$ ± $0,34 \cdot 10^{-3}$	194,37 ± 37,07	23,03 ± 5,21	331,23 ± 51,99

Applikation von EXP 3174:

Nach peroraler Gabe von 10 mg/kg KG EXP 3174 pro Ratte wurden nach 27 Minuten maximale Blutspiegel von 0,4 µg/ml für EXP 3174 gemessen. Für das Gesamtkollektiv ergab die Auswertung der Konzentrations-Zeit-Profile (Abbildung 20) eine mittlere terminale Halbwertszeit von 528 Minuten, die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, die nach der Trapezregel bestimmt wurde, betrug 331 µg·ml⁻¹·min.

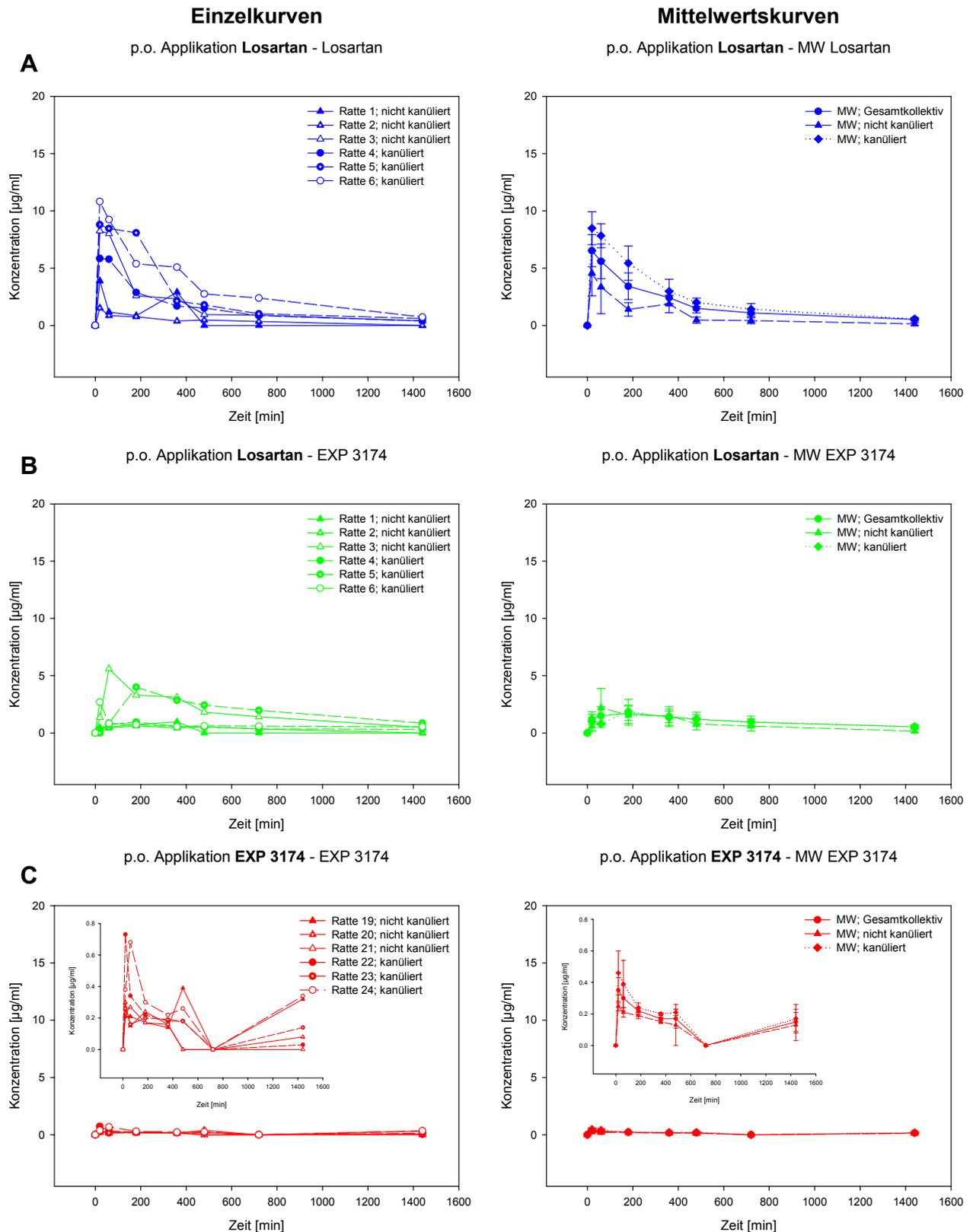


Abbildung 20 A-C: Individuelle und mittlere Blutkonzentrations-Zeit-Profile (Mittelwerte \pm SEM) nach peroraler Applikation von Losartan bzw. von EXP 3174 [10 mg/kg KG]: Nichtkanülierte vs. Gallengangskanülierte Ratten ($n=3$ pro Gruppe) ($M_{G_{\text{Losartan}}}$ 422,9 g/mol, $M_{G_{\text{EXP 3174}}}$ 437,9 g/mol)

A: Blutkonzentrations-Zeit-Profile für Losartan nach Applikation von Losartan

B: Blutkonzentrations-Zeit-Profile für EXP 3174 nach Applikation von Losartan

C: Blutkonzentrations-Zeit-Profile für EXP 3174 nach Applikation von EXP 3174

Bei Unterscheidung der Subkollektive (Kanülierung des Gallenganges) im Rahmen der pharmakokinetischen Auswertung (Tabelle 11) der Daten ergaben sich Unterschiede geringfügiger Art zwischen den beiden Kollektiven, deren Tendenz aber ähnlich ist, wie nach Gabe der Muttersubstanz. So wurden bei nichtkanülierten Ratten bereits nach 20 Minuten maximale Blutspiegel von 0,3 µg/ml gefunden, bei Gallengangskanülierung traten erst nach 33 Minuten Konzentrationsmaxima auf, die aber höher waren und einen mittleren Wert von 0,6 µg/ml annahmen. Nach Gallengangskanülierung ergab die Auswertung der Konzentrations-Zeit-Profile mittlere terminale Halbwertszeiten von 707 Minuten, wogegen die nichtkanülierten Ratten Halbwertszeiten von 348 Minuten hatten. Ebenso war ein Einfluss der Gallengangskanülierung auf die orale Clearance zu finden, wobei die Werte der kanülierten Ratten mit 141,6 ml/min deutlich unter denen der nichtkanülierten Ratten (247,1 ml/min) lagen. Die AUC-Werte lagen nach peroraler EXP 3174-Applikation bei kanülierten Ratten bei 395 µg·ml⁻¹·min, bei nichtkanülierten Versuchstieren bei 268 µg·ml⁻¹·min.

3.3.1.2.2. Bestimmung in der Gallenflüssigkeit

Applikation von Losartan:

Aus den Konzentrations-Zeit-Profilen nach peroraler Applikation (Abbildung 21) von 10 mg/kg KG Losartan ergab sich nach pharmakokinetischer Auswertung (Tabelle 12) der kumulativen Ausscheidungsdaten eine terminale Halbwertszeit von 284 Minuten für Losartan. Der entsprechende mittlere Wert für den aktiven Metaboliten EXP 3174 lag bei 239 Minuten.

Maximale mittlere Gallekonzentrationen in Höhe von 8,5 µg/ml wurden für Losartan nach 20 Minuten gemessen, die mittlere Maximalkonzentration von EXP 3174 war nach 127 Minuten mit 2,6 µg/ml erreicht.

Bei dieser Applikationsart und einem durchschnittlichen Gallefluss von 4,9 µl/min wurde für den Angiotensin-II-Antagonisten Losartan insgesamt (0-26 h) eine ausgeschiedene Menge von 70 µg ermittelt. Die insgesamt ausgeschiedene Menge von EXP 3174 betrug dagegen 206 µg und war somit um den Faktor 2,9 höher. Dies entspricht einer biliären Ausscheidung von 2% der Dosis als unverändertes Losartan und 7% der Dosis als EXP 3174 innerhalb von 26 Stunden.

Tabelle 12: Übersicht kinetischer Parameter nach nichtkompartimenteller Analyse der Galldata (kumulative Ausscheidung) nach peroraler Losartan- bzw. EXP 3174-Applikation (Mittelwerte ± SEM für n=3 Ratten)

Pharmakokinetische Parameter:	Applikation von:		
	Losartan		EXP 3174
	Losartan	EXP 3174	EXP 3174
Dosis 10 mg/kg KG [mg/Tier]	3,01 ± 0,01	-	2,89 ± 0,02
C_{max} [µg/ml]	8,49 ± 1,44	2,55 ± 0,88	0,56 ± 0,15
t_{max} [min]	20 ± 0	126,67 ± 53,33	33,33 ± 13,33
t_{1/2} [h]	284,17 ± 13,67	239,41 ± 24,94	268,92 ± 11,59
λ [min⁻¹]	2,45 ± 1,19·10 ⁻⁴	2,94·10 ⁻³ ± 2,79·10 ⁻⁴	3,45·10 ⁻³ ± 1,97·10 ⁻⁴
Ausgeschiedene Menge Ae_{0-26h} [µg]	70,30 ± 14,76	205,67 ± 48,67	79,27 ± 27,46
Mittlerer Gallefluss [µl/min]	4,95 ± 0,21	-	4,54 ± 0,12

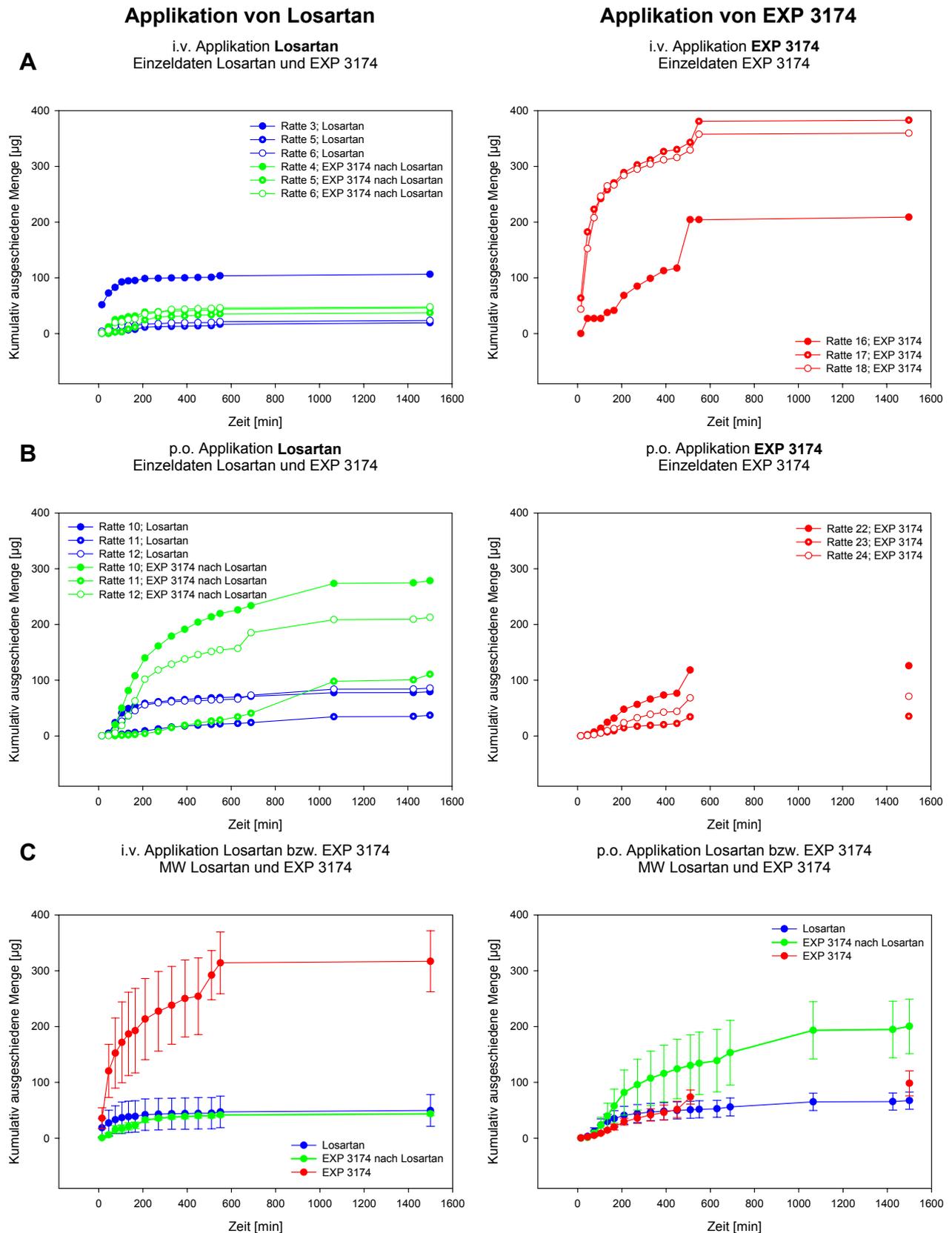


Abbildung 21 A-C: Nachweis von Losartan und von EXP 3174 in der Gallenflüssigkeit: Individuelle und mittlere kumulative biliäre Ausscheidung (Mittelwerte \pm SEM für $n=3$ Ratten) von Losartan und EXP 3174 nach intravenöser [3 mg/kg KG] und peroraler Applikation [10 mg/kg KG] von Losartan bzw. EXP 3174

A: Einzeldaten nach i.v.-Applikation

B: Einzeldaten nach p.o.-Applikation

C: Mittelwerte nach i.v.- (A) und p.o.-Applikation (B) (MG_{Losartan} 422,9 g/mol, $MG_{\text{EXP 3174}}$ 437,9 g/mol)

Applikation von EXP 3174:

Die Konzentrations-Zeit-Profile nach peroraler Applikation (Abbildung 21) von durchschnittlich 10 mg/kg KG Losartan zeigten, dass die maximale mittlere Gallekonzentration in Höhe von 0,6 µg/ml bereits nach 33 Minuten erreicht wurde. Die pharmakokinetische Auswertung (Tabelle 12) der kumulativen Ausscheidungsdaten ergaben eine terminale Halbwertszeit von 267 Minuten für EXP 3174. Bei dieser Applikationsart und einem durchschnittlichen Gallefluß von 4,5 µl/min wurde für den aktiven Metaboliten des Angiotensin-II-Antagonisten Losartan insgesamt (0-26 h) eine ausgeschiedene Menge von 79 µg ermittelt. Dies entspricht einer biliären Ausscheidung von 3% der Losartandosis in Form von EXP 3174 innerhalb von 26 Stunden.

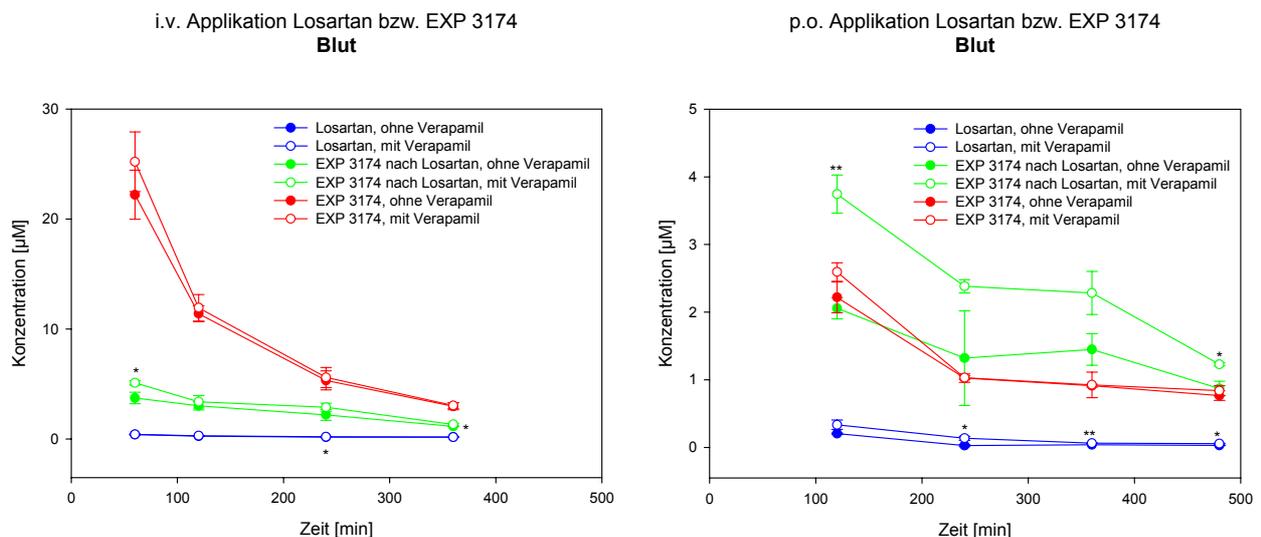
3.3.2. Verteilungsstudie

Zur Quantifizierung des Verteilungsverhaltens der Angiotensin-II-Antagonisten Losartan und dessen aktivem Metaboliten EXP 3174 wurden an männlichen White-Wistar-Ratten Verteilungsstudien durchgeführt. Das in Kapitel 5.3.3. explizit beschriebene Versuchsdesign umfasste eine separate intravenöse sowie perorale Gabe von Losartan bzw. EXP 3174 jeweils mit und ohne Comedikation von Verapamil.

Da in früheren Untersuchungen (Soldner 1996 (1)) nur die Verteilungscharakteristik von Losartan und EXP 3174 nach Losartangabe untersucht wurde, sollte mit den hier durchgeführten Experimenten bestimmt werden, ob Unterschiede zwischen i.v.- und p.o.-Applikation von Losartan bzw. EXP 3174 bestehen und wie sich der aktive Metabolit nach separater Gabe verhält. Ebenso war aus Bindungsstudien (Kapitel 3.1.1.2.) bekannt, dass Losartan an P-GP bindet, so dass ebenfalls der Einfluss des P-GP-Modulators Verapamil auf die Organverteilung der Angiotensin-II-Antagonisten ermittelt wurde.

3.3.2.1. Einfluss des P-GP-Modulators Verapamil auf das Verteilungsverhalten von Losartan und EXP 3174

Die Konzentrations-Zeit-Profile von Losartan und EXP 3174 in Blut und Gewebe (Leber, Niere, Darmsegmente und Herz), die sowohl nach separater i.v.- als auch nach p.o.-Applikation ermittelt wurden, zeigten einen sehr ähnlichen Verlauf (Abbildung 22). Ein deutlicher Verapamileinfluss war bei beiden Substanzen in der Leber und in der Niere zu sehen.



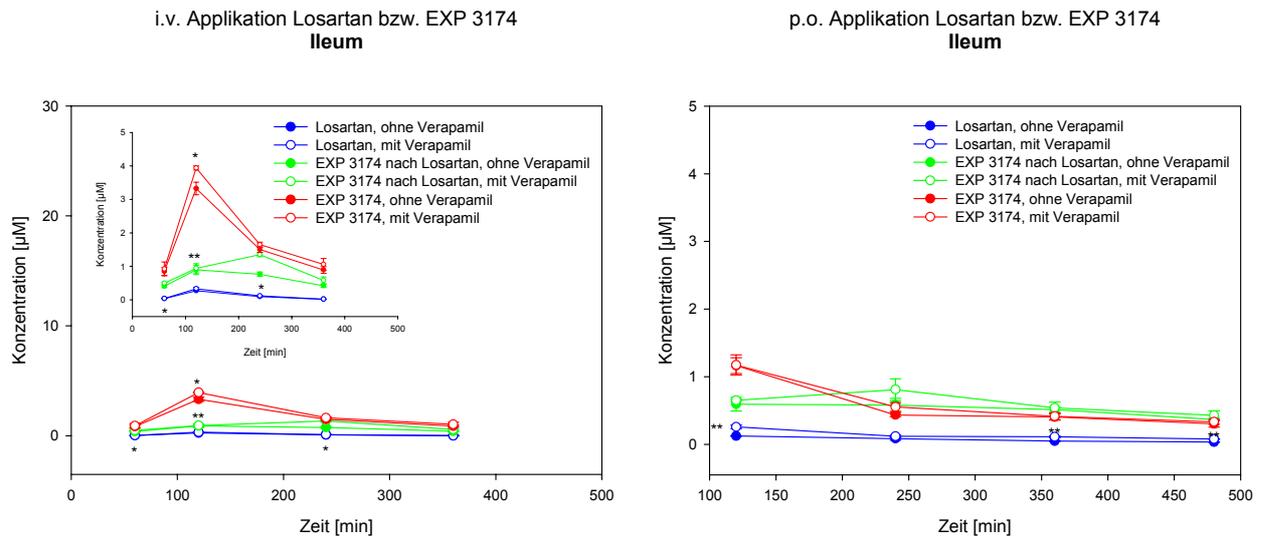


Abbildung 22: Einfluss von Verapamil: Konzentrations-Zeit-Kurven von Losartan, EXP 3174 in Blut und Ileum mit und ohne Comedikation von Verapamil nach i.v.- und p.o.-Gabe von Losartan bzw. EXP 3174 (Mittelwert \pm SEM von n=3 Versuchen, *p<0,05, **p<0,01)

Unabhängig von der Applikationsart und der Behandlung (Comedikation mit Verapamil) waren maximale Substanzkonzentrationen für beide Substanzen in der Leber und minimale im Herz zu finden. Obwohl die Konzentrationen von appliziertem Losartan und EXP 3174 in den meisten Geweben abnahm, zeigte sich nach intravenöser Applikation sowohl von Losartan als auch von EXP 3174 im Ileum (Abbildung 22) nach 2 Stunden ein Konzentrationsmaximum. Dieses Phänomen war ebenso bei Verapamil-Comedikation zu finden, trat aber nicht nach peroraler Applikation auf.

Tabelle 13: Mittlere AUD-Werte [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$] (Fläche unter den Datenpunkten) nach i.v.- und p.o.-Applikation von Losartan bzw. EXP 3174 mit und ohne Comedikation von Verapamil berechnet aus den Konzentrations-Zeit-Profilen in Blut und Gewebe, *p<0,05, **p<0,01

Gewebe	AUD [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$]					
	Intravenöse Applikation von 3 mg/kg KG:			Perorale Applikation von 10 mg/kg KG:		
	Losartan	EXP 3174	EXP 3174	Losartan	EXP 3174	EXP 3174
	Ohne Verapamil-Comedikation					
Blut	278,35	334,13	1097,22	112,95	250,74	179,93
Ileum	158,19	91,40	243,84	109,29	82,71	82,66
Jejunum	228,04	79,56	198,61	55,55	54,23	57,61
Leber	1718,69	1344,61	712,01	6787,50	2070,34	5184,78
Niere	297,38	119,19	561,10	253,91	124,56	105,61
Herz	31,62	52,85	204,01	35,69	37,52	36,33
	Mit Verapamil-Comedikation					
Blut	309,94*	386,37	1172,83	200,91	374,95*	192,61
Ileum	194,27	129,42*	280,95*	203,92**	99,26	90,42*
Jejunum	273,88	87,60	226,92*	111,37**	62,71	65,86
Leber	3556,37	1989,33	1003,49*	7838,05	2409,52	6280,01
Niere	356,60	154,61	669,29**	406,93**	149,86	122,45
Herz	37,04	58,69	244,88	58,05	56,56	42,17**

Nach Auswertung der Konzentrations-Zeit-Profile und Berechnung der AUD-Werte (Tabelle 13) zeigte sich, dass neben der Leber in Blut und Niere im Vergleich zu den anderen Geweben höhere AUD-Werte gefunden wurden. Nach intravenöser Losartanapplikation konnten für Losartan im **Blut** und im **Nierengewebe** keine signifikant unterschiedlichen AUD-Werte ermittelt werden, für EXP 3174 nach Losartangabe war die Fläche unter den Datenpunkten im Blut um den Faktor 2,8 größer als im Nierengewebe, bei separater EXP 3174-Gabe unterschieden sich die Werte nur um den Faktor 1,9. Bei gleichzeitiger Verapamilgabe kam es zu keiner Veränderung der Tendenz, wobei aber allgemein höhere AUD-Werte berechnet wurden, die Faktoren aber annähernd konstant blieben.

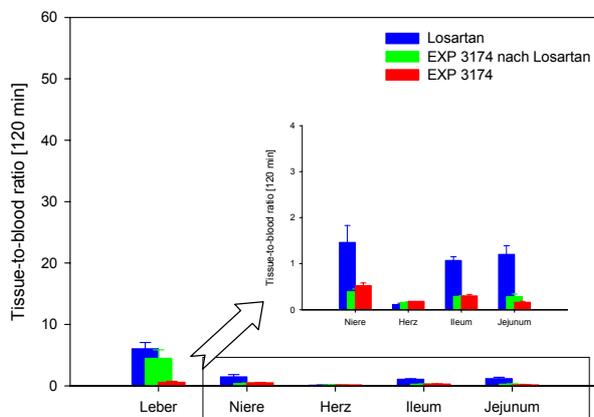
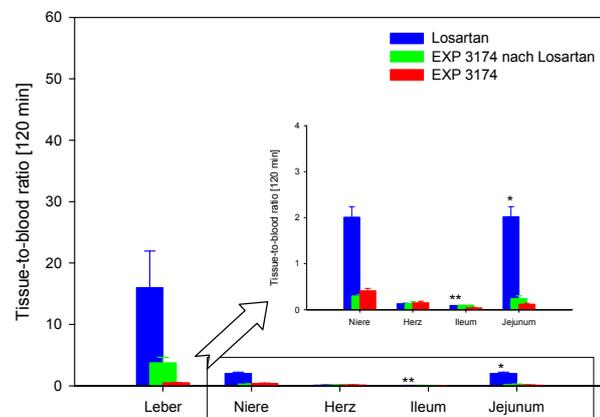
Bei peroraler Applikation von Losartan wurden sowohl in Gegenwart von Verapamil als auch ohne Verapamil-Comedikation in der Niere um den Faktor 2 erhöhte AUD-Werte gefunden. Bei separater Applikation von EXP 3174 sowie nach Losartanapplikation waren die Werte für EXP 3174 im Blut hingegen annähernd um den Faktor 2 erhöht. Die Comedikation von Verapamil führte wiederum in allen drei Fällen zu einem Anstieg der AUD-Werte.

Unabhängig von einer Comedikation mit Verapamil ergab die Berechnung der AUD-Werte nach peroraler Applikation in der **Leber** generell höhere Werte als nach i.v.-Gabe, wobei unter Verapamileinfluss im allgemeinen ein Anstieg der AUD-Werte detektiert wurde. Bei intravenöser Gabe von Losartan wurden sowohl für Losartan als auch für den aktiven Metaboliten höhere AUD-Werte ermittelt. Wurde EXP 3174 hingegen separat appliziert, konnten in der Leber nur AUD-Werte berechnet werden, die im Vergleich zum Losartan um den Faktor 2,4 und im Vergleich zum EXP 3174 nach Losartangabe um den Faktor 1,9 geringer waren. Nach peroraler Gabe von Losartan hingegen wurden für die Muttersubstanz Losartan wiederum die höchsten AUD-Werte errechnet, die Werte für EXP 3174 lagen aber nach separater Gabe um den Faktor 2,5 höher als nach Losartangabe.

Im **Darmgewebe** wurden nach peroraler Applikation von Losartan bzw. EXP 3174 generell für beide Behandlungsarten im Ileum höhere AUD-Werte berechnet als im Jejunum, was ebenfalls mit den Ergebnissen für EXP 3174 nach intravenöser Losartan- bzw. EXP 3174-Gabe übereinstimmte. Lediglich für Losartan wurden nach i.v.-Gabe im Jejunum höhere AUD's ermittelt.

Die geringsten Flächen unter den Datenkurven wurden im **Herzen** gefunden, wobei nach i.v.-Gabe von EXP 3174 signifikant höhere Werte gefunden wurden als für Losartan nach der gleichen Applikationsform. Nach Losartangabe waren die AUD-Werte für den aktiven Metaboliten um den Faktor 1,7 höher als für die Muttersubstanz. Nach separater peroraler Gabe wurden annähernd konstante AUD-Werte für beide Substanzen im Herzen gefunden.

Zur Abschätzung von relativen Veränderungen in der Gewebeverteilung nach Verapamilgabe wurden über einen bestimmten Zeitraum die Gewebe-zu-Blut-Konzentrationsverhältnisse (Tissue-to-blood ratios, TBR) für Losartan und EXP 3174 berechnet und analysiert. Um die Verteilungsvorgänge nach intravenöser und peroraler Gabe direkt vergleichen zu können, wurden die TBR-Werte 2 und 6 Stunden nach der Applikation miteinander verglichen (Abbildungen 23; 24). In die Betrachtungen flossen aber ebenfalls die 1 h-Werte nach i.v.-Gabe und die 8 h-Werte nach p.o.-Gabe mit ein.

i.v. Applikation **ohne** Verapamili.v. Applikation **mit** Verapamil

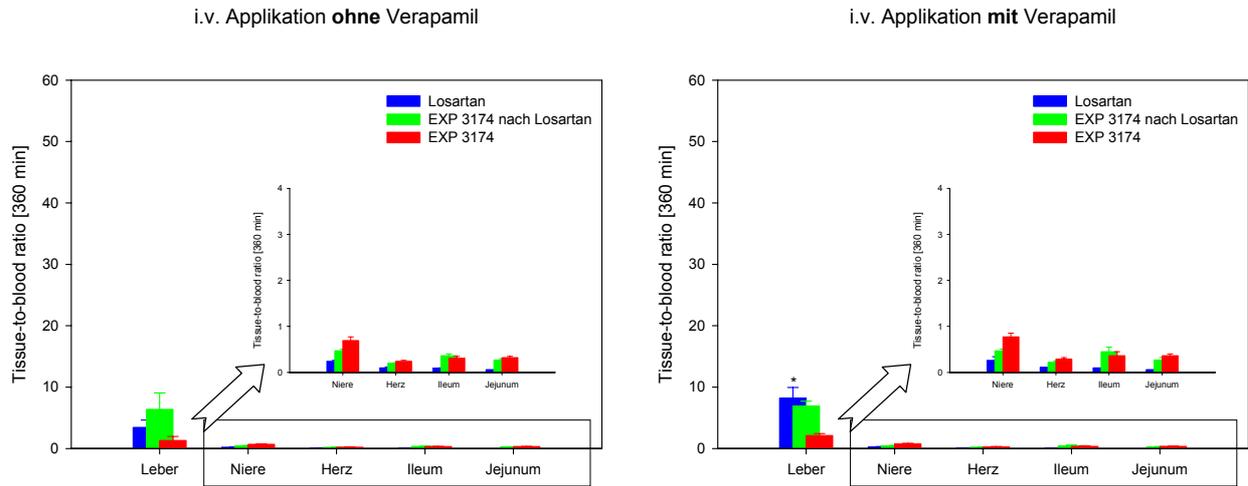
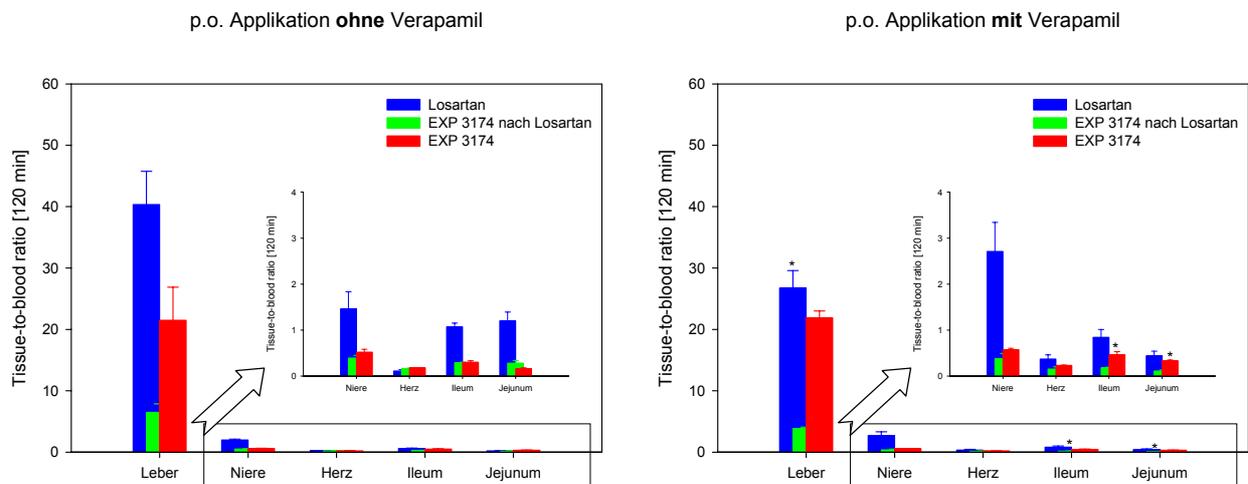


Abbildung 23: TBR nach 120 und 360 Minuten für Losartan und EXP 3174 mit und ohne Coadministration von Verapamil nach intravenöser Gabe von Losartan bzw. EXP 3174 (Mittelwert \pm SEM von n=3 Versuchen, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Nach **intravenöser Applikation** (Abbildung 23) von Losartan konnte ein kontinuierlicher Abfall des TBR (Tabelle 14) für Losartan mit der Zeit in fast allen Geweben ermittelt werden, der ebenfalls unter Verapamileinfluss zu sehen war. Lediglich im Herzen blieben die Werte für Losartan konstant und konnten auch durch Verapamil-Comedikation nicht wesentlich verändert werden. Eine gleichzeitige Gabe von Losartan und Verapamil führt in Niere, Jejunum und in der Leber zu einer stärkeren Veränderung des TBR über die Zeit. Aufgrund der hohen Stoffwechselaktivität der Leber wird dies aber nur deutlich, wenn man in die Betrachtungen die erste Stunde nach Applikation mit einbezieht. Im Herzen und im Ileum hatte Verapamil hingegen keinen Einfluss auf das Ausmaß der Veränderung. Betrachtet man nun den aktiven Metaboliten EXP 3174, so zeigte sich sowohl nach separater als auch nach Losartangabe in allen Geweben ein Anstieg des TBR, dessen Ausmaß unter Verapamil-Comedikation in fast allen Fällen erhöht war.

Für die Muttersubstanz Losartan konnte nach **peroraler Applikation** (Abbildung 24) über den gesamten Zeitraum ebenso wie nach i.v.-Gabe ein kontinuierlicher Anstieg der TBR-Werte (Tabelle 14) in allen Geweben gefunden werden. Bei gleichzeitiger Verapamilgabe wurde nur in der Niere eine geringfügige Senkung des TBR gefunden, in allen anderen Geweben kam es ebenfalls zu einem Anstieg.



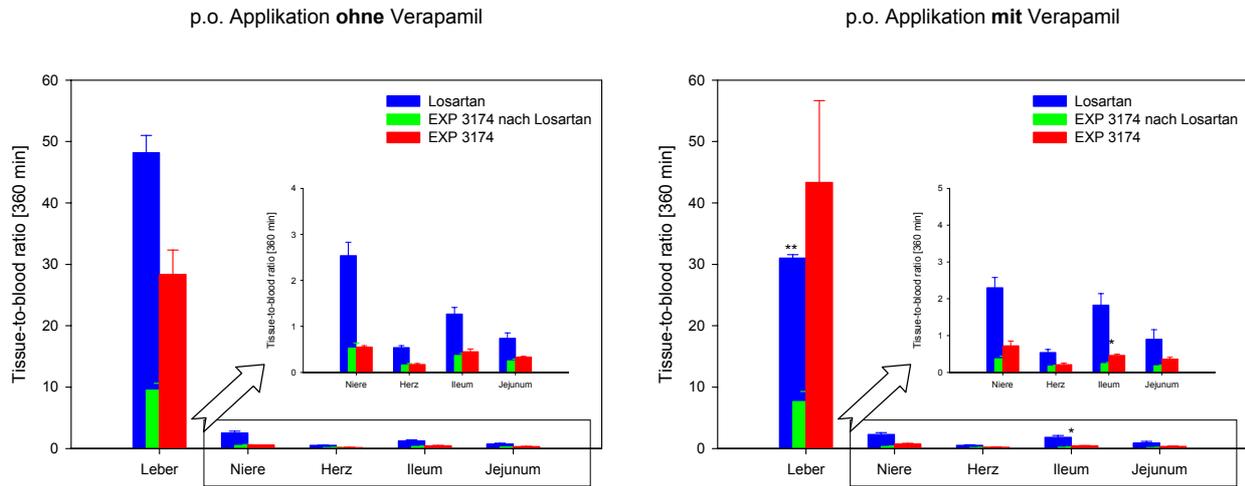


Abbildung 24: TBR nach 120 und 360 Minuten für Losartan und EXP 3174 mit und ohne Coadministration von Verapamil nach peroraler Gabe von Losartan bzw. EXP 3174 (Mittelwert \pm SEM von $n=3$ Versuchen, $*p<0,05$, $**p<0,01$)

Nach separater EXP 3174-Applikation wurde in der Leber und in der Niere mit der Zeit ein Anstieg des TBR gefunden, der bei gleichzeitiger Verapamil-Coadministration ausgeprägter war. In Herz und Ileum fielen die TBR-Werte mit der Zeit ab und im Jejunum waren sie über den gesamten Zeitraum konstant. Unter Verapamileinfluss wurde weder im Darmgewebe (Ileum und Jejunum) noch im Herzen eine Veränderung der TBR mit der Zeit gefunden, die Größenordnung der Werte war auch vergleichbar mit denen ohne gleichzeitige Verapamilgabe.

Für den aktiven Metaboliten EXP 3174 konnte nach Losartanapplikation ein höheres Gewebe-zu-Blut-Verteilungsverhältnis (TBR) in der Leber und im Darmgewebe (Ileum und Jejunum) gefunden werden, das bei Coadministration von Verapamil nicht wesentlich erhöht war. In der Niere konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum sowie unter Verapamileinfluss keine Veränderung des TBR gefunden werden. Im Herzen wurde ohne gleichzeitige Verapamilgabe für die Losartanapplikation ein niedrigeres Gewebe-zu-Blut-Verteilungsverhältnis (TBR) gefunden als bei EXP 3174-Applikation. Bei Coadminstration waren die Werte nicht unterschiedlich.

Tabelle 14: Relative Veränderung der Gewebe-zu-Blut-Verteilungsverhältnisse (Tissue-to-blood ratios (TBR)) in Abhängigkeit von der Zeit für Losartan und EXP 3174: Vergleich i.v.- und p.o.-Applikation von Losartan bzw. EXP 3174 (i.v.: 3 mg/kg KG; p.o.: 10 mg/kg KG) mit und ohne Comedikation von Verapamil (p.o.: 20 mg/kg KG), *p<0,05, **p<0,01

		Tissue-to-blood-ratios (TBR)															
		Intravenöse Applikation von Losartan (3 mg/kg KG)						Perorale Applikation von Losartan (10 mg/kg KG)									
Gewebe	Zeit [h]	Losartan			EXP 3174			Losartan			EXP 3174						
		1 h	2 h	4 h	6 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	2 h	4 h	6 h	8 h			
Ohne Verapamil-Comedikation																	
Leber		9,45	6,05*	5,86*	3,43*	3,95	4,48	4,77	6,39	40,35	168,77	48,19	25,43	6,50*	7,18**	9,50**	13,27**
Niere		1,90	1,46	0,65	0,24	0,34	0,39	0,39	0,47	1,99**	3,56	2,54	2,63**	0,53	0,48	0,53*	0,64**
Herz		0,10	0,11	0,14	0,10	0,18	0,16	0,19	0,20	0,27	0,72	0,54	0,42**	0,23	0,16	0,16	0,21**
Ileum		0,09	1,07	0,55	0,09	0,11*	0,29	0,42**	0,36	0,61	1,51	1,27**	1,21**	0,29**	0,26	0,37	0,44*
Jejunum		1,69	1,20	0,32	0,06	0,37	0,28	0,24	0,27	0,23	1,28**	0,74*	0,38	0,18**	0,19	0,25	0,31*
Mit Verapamil-Comedikation (20 mg/kg KG p.o.)																	
Leber		16,00	10,29*	11,90*	8,21*	3,76	5,38	5,41	6,93	26,72	69,49	31,03	14,54	3,83*	6,67**	7,66**	10,37**
Niere		2,01	1,53	0,66	0,26	0,30	0,44	0,42	0,47	2,71**	1,64	2,30	1,58**	0,38	0,46	0,37*	0,46**
Herz		0,13	0,10	0,14	0,11	0,13	0,14	0,16	0,22	0,37	0,40	0,54	0,37**	0,15	0,19	0,17	0,19**
Ileum		0,09	1,11	0,60	0,10	0,10*	0,29	0,48**	0,45	0,84	0,92	1,83**	1,46**	0,18**	0,34	0,24	0,35*
Jejunum		2,02	1,16	0,32	0,06	0,24	0,28	0,19	0,27	0,44	0,76**	0,90*	0,25	0,11**	0,19	0,18	0,26*
% Veränderung durch Verapamil-Comedikation																	
Leber		69,37	70,26	102,96	139,57	-4,71	19,94	13,32	8,38	-33,78	-58,83	-35,60	-42,82	-41,11	-7,11	-19,36	-21,84
Niere		5,68	4,62	1,19	6,67	-13,35	13,92	8,73	1,22	35,76	-53,99	-9,33	-39,77	-27,10	-4,25	-30,44	-27,66
Herz		24,61	-7,25	-1,26	13,77	-24,38	-10,75	-14,62	8,71	38,86	-44,44	1,06	-11,67	-33,53	15,68	8,66	-8,86
Ileum		3,79	3,36	9,18	14,46	-15,33	-1,79	15,12	24,20	36,56	-39,07	43,52	21,10	-38,40	26,87	-34,43	-20,76
Jejunum		19,75	-3,56	-1,75	9,54	-34,57	-0,70	-20,93	-1,40	88,23	-41,13**	21,60*	-32,31	-37,53	-1,51	-28,91	-16,53

Gewebe	Tissue-to-blood-ratios (TBR)							
	Applikation von EXP 3174							
	Intravenös (3 mg/kg KG)				Peroral (10 mg/kg KG)			
Zeit [h]	1 h	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h	8 h
Ohne Verapamil-Comedikation								
Leber	0,44	0,60	0,80	1,32	21,50*	37,51*	28,38	31,28*
Niere	0,35	0,52	0,67	0,69	0,59	0,63	0,55	0,60**
Herz	0,15	0,18	0,26	0,24	0,23	0,22*	0,17	0,19**
Ileum	0,04	0,30*	0,30	0,31	0,53**	0,42	0,45	0,41**
Jejunum	0,11	0,16	0,26	0,32	0,33**	0,31	0,33	0,35**
Mit Verapamil-Comedikation (20 mg/kg p.o.)								
Leber	0,52	0,89	0,86	2,14	21,89*	40,39*	43,35	30,78*
Niere	0,41	0,60	0,72	0,77	0,57	0,70	0,72	0,60**
Herz	0,15	0,18	0,24	0,29	0,23	0,25*	0,21	0,18**
Ileum	0,04	0,34*	0,31	0,36	0,46**	0,53	0,46	0,41**
Jejunum	0,12	0,19	0,26	0,36	0,33**	0,36	0,36	0,36**
% Veränderung durch Verapamil-Comedikation								
Leber	16,96	49,10	7,32	61,73	1,81	7,67	52,75	-1,59
Niere	16,35	14,67	6,87	11,96	-3,69	10,69	29,32	-1,37
Herz	-2,98	1,54	-7,23	22,05	-0,33	12,13	25,89	-2,53
Ileum	-5,75	13,90	4,17	18,18	-13,16	25,52	3,79	0,78
Jejunum	6,31	19,04	-1,93	9,70	-0,52	14,91	9,63	2,82

4. Diskussion

P-GP als Effluxtransportsystem ist verantwortlich dafür, dass nur ein geringer Teil der applizierten Substanz in den systemischen Kreislauf gelangt und somit zur Wirkung kommen kann. Unter physiologischen Bedingungen dient es dem Organismus als Schutz, um das Eindringen von Xenobiotika in bestimmte anatomische Kompartimente einzuschränken. In der Chemotherapie ist P-GP aber verantwortlich für die Ausbildung von Resistenzmechanismen und somit für das Versagen der Therapie mit Zytostatika, da es die absorbierte Menge reduziert.

Nachweislich ist die Affinität zum Effluxtransporter P-GP im GIT eine potentielle Quelle für Substanz-Substanz- oder Substanz-Nahrungsmittel-Interaktionen, die das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Absorption nach oraler Applikation verändern können (Hunter 1997). In der Arzneistoffentwicklung ist es daher von Vorteil, die Affinität zu einem solchen Transportsystem frühzeitig zu kennen und mögliche Komplikationen in der Pharmakokinetik vorhersagen zu können.

Einige experimentelle Methoden zur Bestimmung der Substanzaffinität zum P-GP wurden früher beschrieben und zeigten, dass In-situ-Perfusionen und Ex-vivo-Transportstudien eine nützliche Hilfe sind, jedoch von hoher Variabilität und geringem Probendurchsatz begleitet werden. In In-vitro-Transportstudien mit Caco-2-Zellmonolayern ist es möglich, die Richtungsabhängigkeit und Hemmbarkeit des Transporters nachzuweisen.

Frühere experimentell-pharmakokinetische Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (Spahn-Langguth 1998) mit Losartan hatten Hinweise dafür ergeben, dass Losartan und eventuell auch EXP 3174, dessen Hauptmetabolit, Substrate für Transporter des Typs von - z.B. intestinale - P-Glykoprotein sein könnten.

Im Rahmen der hier durchgeführten Arbeiten sollten - mit experimentellen Modellen unterschiedlicher Komplexität - die Affinität zum entsprechenden Transporter definiert und die Relevanz dieses Befundes in Bezug auf den Membrantransport z.B. in vitro (Zellkulturen) und in vivo (Kinetik an der Ratte) untersucht werden. Von besonderem Interesse waren auch methodische Aspekte wie die Entwicklung und Verbesserung des verwendeten Bindungsassays, die Expression von Transportern in Zellkulturen in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit sowie Untersuchungen zur Abhängigkeit der intestinalen Permeabilität von der Aktivitätsphase bei der Ratte. Da Transporter-bedingte Prozesse auch Ursache für kinetische Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen sein können, stand die punktuelle Untersuchung des Interaktionspotentials ebenfalls im Vordergrund.

Zunächst wurde das P-GP-Bindungsassay weiterentwickelt und die entsprechenden Affinitätsdaten für Losartan und EXP 3174 im Vergleich mit anderen Liganden erhoben.

4.1. Bindungsassay und Bindungsdaten

4.1.1. Entwicklung

In dem von Döppenschmitt (1998) entwickelten und im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit Koggel (2002) modifizierten Bindungsassay wurde eine Methode erarbeitet, die eine einfache und schnelle Bestimmung der Substanzaffinität zum P-GP ermöglichte. Sie beruht auf der Bestimmung der Affinität der ungelabelten Substanz basierend auf der Messung der Konzentrationsabhängigkeit der Verdrängung des Radioliganden, in diesem Falle ^3H -Talinolol, das aufgrund seiner im Vergleich mit ^3H -Verapamil und ^3H -Vinblastin geringeren nichtspezifischen Bindung bevorzugt wurde.

Wie zahlreiche der heute neu entwickelten Arzneistoffe, so waren auch verschiedene der zu untersuchenden Substanzen gekennzeichnet durch ihre Schwerlöslichkeit. In Biotransformationsstudien werden aus diesem Grund häufig Lösungsvermittler verwendet, um ausreichende Testkonzentrationen zu erzielen. Das Cosolventien, wie z.B. PEG400, Tween80 und Cremophor EL selbst Affinität zum P-GP besitzen, wurde bereits in früheren Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen nachgewiesen (Yamashita 2000, Wagner 2001). In unseren Studien konnte durch konzentrationsabhängige Verdrängung des Radioliganden ^3H -Talinolol eine Affinität einiger sehr häufig eingesetzter Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, Acetonitril und DMSO) zum Effluxtransporter bestätigt werden. Ebenso führten Veränderungen des pH-Wertes des Inkubationsmediums zur Verdrängung des Radioliganden von der Bindungsstelle.

4.1.2. Datengewinnung (IC₅₀-Werte)

In Bindungsexperimenten mit Losartan und EXP 3174 konnte eine höhere Affinität der Muttersubstanz als für den Metaboliten bestimmt werden und eine Bindung beider Stoffe an P-GP nachgewiesen werden. Die IC₅₀-Werte lagen in einem Bereich von 1-2 mM. Übereinstimmend mit den Untersuchungen von Leisen (2002 (1)) ergab sich auch für Losartan und EXP 3174 eine Korrelation der IC₅₀-Werte mit der Lipophilie der Substanzen.

4.2. In-vitro- und In-situ-Transportstudien

In-vitro- und In-situ-Modelle, die die Arzneistoffabsorption in vivo beschreiben können, wurden entwickelt, um ein schnelles Screening von potentiellen Wirkstoffen zu ermöglichen, aber auch, um epitheliale Transportprozesse zu untersuchen. Die meisten der heute genutzten intestinalen Absorptionsmodelle besitzen Nachteile, die von verschiedenen Arbeitsgruppen genauer evaluiert wurden (Ungell 1997).

Das Caco-2-Zellmodell ist das am weitesten verbreitete In-vitro-Modell für Untersuchungen von epithelialen Transportprozessen (Hidalgo 1989). In Kultur bilden diese Zellen polarisierte Monolayer, deren apikale Membranseite mit Brush-Border-Mikrovilli ausgestattet ist. Enzyme, Transportsysteme sowie Rezeptoren wurden nachgewiesen, die typisch für das intestinale Epithel sind. Im Vergleich mit dem komplexen In-vivo-System sind die Zellmonolayer charakterisiert durch die hohe Dichte an tight junctions, die Uniformität und das Fehlen der Mukusproduktion, was z.T. als Nachteil anzusehen ist. Das Caco-2-Zellmodell ermöglicht es, intestinale Transportprozesse in vitro zu untersuchen, und gestattet so Rückschlüsse mit guter Korrelation auf In-vivo-Vorgänge.

Die intestinale Permeabilität von Substanzen kann in In-situ-Perfusionen unter Steady-state-Bedingungen aus der Abnahme der Substanzkonzentration im intestinalen Lumen ermittelt werden. In-vitro-Experimente hingegen nutzen Gewebesegmente in der Ussing-Kammer oder Zellkulturen zur Bestimmung der Permeabilität, resultierend aus Messungen im Receiver-Kompartiment (Hilgendorf 1999).

4.2.1. Caco-2-Zellmonolayer

4.2.1.1. Kulturzeit und P_{eff}-Werte

Die in den differenzierten, polarisierten Zellen gebildeten tight junctions schränken nicht nur den parazellulären Transport von kleinen hydrophilen Molekülen ein, sondern sind auch gleichzeitig mitverantwortlich für den transepithelialen Widerstand (TEER) der gebildeten Monolayer.

In unserem Testsystem wurde der TEER herangezogen, um die Integrität der Monolayer zu überprüfen. Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit zum Einen von der Passage der Caco-2-Zellen (P30/31<P78/79), der Kultivierungsfläche (1,13 cm²>4,71 cm²) und in geringem Ausmaß auch von der Kulturzeit. Frühere Studien (Regev 1999) erbrachten den Nachweis, dass die Membranfluidität durch Cosolventien (Ether, Tween20) beeinflussbar ist. Unsere Studien ergaben, dass auch Zusätze von Verapamil einen Einfluss auf den TEER (Abnahme) und den Mannitol-Flux (Zunahme) der gebildeten Monolayer haben.

Transportstudien mit Modellsubstanzen für verschiedene Transportwege sollten Aufschluss geben, ob die experimentellen Bedingungen (Kulturzeit, Passage) Einfluss auf den Substanztransport haben.

Dabei wurden zur Charakterisierung der parazellulären Route des Membrantransportes die Substanzen Atenolol und Mannitol verwendet (Collett 1997). Aufgrund der geringen Permeabilität von Mannitol kann der Mannitol-Flux neben dem TEER auch zur Überprüfung der Unversehrtheit der Monolayer herangezogen werden. Die Dauer der Kulturperiode zeigt jedoch weder bei Mannitol noch bei Atenolol einen Einfluss auf die P_{eff}-Werte. Die lipophileren Moleküle Metoprolol und Propranolol, die trotz P-GP-Affinität (Karlson 1993, Döppenschmitt 1998, Yang 2000) das intestinale Epithel über die transzelluläre Route passieren (Adson 1995, Hilgendorf 2000), zeigten jedoch mit der Kulturzeit veränderte Permeabilitätswerte. Obwohl Radioligandenbindungsstudien (Döppenschmitt 1998, Neuhoff 2000) für

Propranolol (IC_{50} 573 μ M) eine höhere Affinität zum Effluxtransporter P-GP nachgewiesen hatten als für Metoprolol (IC_{50} 1300 μ M), zeigte sich beim hydrophileren Metoprolol eine Abnahme und beim lipophilen Propranolol ein Anstieg der Permeabilitäten.

Modellsubstanzen, die aktiv über ins Zellinnere gerichtete Transportsysteme absorbiert werden (S-Baclofen, Gly-Pro, L-Phenylalanin) zeigen höhere P_{eff} -Werte mit zunehmender Dauer der Kulturperiode, was auf eine zunehmende Transporteraktivität schließen lässt. P-GP-vermittelte Transportprozesse (Talinolol) zeigen weitestgehend konstante Permeabilitäten und stimmen mit den Studien von Anderle (1998) überein, die keine Veränderung der P-GP-Exprimierung mit der Kulturzeit auf Polycarbonatfiltern zeigten, aber nachwiesen, dass die P-GP-Exprimierung in den jüngeren Passagen stärker ist als in den älteren (Anderle 1998, Makhey 1998).

4.2.1.2. Permeabilitätsdaten von Losartan und EXP 3174

Aus den Ergebnissen der früher durchgeführten In-vivo-Studien wurde ein Einfluss von aktiven Transportprozessen auf die Absorption bzw. Sekretion der Angiotensin-II-Antagonisten Losartan und EXP 3174 abgeleitet, so dass in unterschiedlichen Caco-2-Zellpassagen die Richtungsabhängigkeit des Transportes als ein wichtiges Charakteristikum untersucht wurde. In beiden Passagen konnte sowohl für Losartan als auch für den aktiven Metaboliten EXP 3174 nachgewiesen werden, dass der basolateral-apikale Transport stets höher ist als der korrespondierende apikal-basolaterale Transport, was auf sekretorische Prozesse (P-GP, MRP) hindeutet. Die Permeabilitäten der Muttersubstanz waren dabei generell höher als die des Metaboliten, wobei Studien in verschiedenen Zellpassagen in der älteren Passage (P78/79) geringfügig höhere Werte annahmen als in der jüngeren (P30/31) und mit zunehmender Kulturdauer nichtsignifikante Anstiege in der Permeabilität in beiden Transportrichtungen (a-b und b-a) gefunden wurden.

Transportuntersuchungen an Caco-2-Zellmonolayern ergaben, dass in Gegenwart des P-GP-Inhibitors Verapamil die a-b-Transportraten von beiden Substanzen anstiegen und die b-a-Raten absanken. Diese Ergebnisse stimmen mit während der Anfertigung dieser Arbeit von Soldner (2000) publizierten Daten überein, die in MDCK-Zellen fand, dass Losartan und sein aktiver Metabolit EXP 3174 Substrate für ein aktives Effluxsystem (P-GP) sind, aber auch andere Transporter in die Absorption von Losartan involviert sind.

4.2.2. In-situ-Perfusionen

Hanafy (2001) optimierte das seit langem bekannte intestinale Perfusionsmodell (Doluisio 1969, Fagerholm 1996) in der Art, dass Veränderungen im Tierhandling und in den Versuchsbedingungen zu stabilen Perfusionsbedingungen im Beobachtungszeitraum führten und das auch bei Einsatz einer geringen Tierzahl aufgrund der geringen intraindividuellen Schwankungen zuverlässige Ergebnisse geliefert werden (Hanafy 2001).

4.2.2.1. Permeabilitätsbestimmungen

In den Perfusionsstudien, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, sollte der Einfluss diverser Inhibitoren unterschiedlicher intestinaler Transportsysteme auf die Permeabilität der Angiotensin-II-Antagonisten Losartan und EXP 3174 getestet werden, um deren Transporteigenschaften näher charakterisieren zu können.

Wiederholte Perfusionen unter vergleichbaren Bedingungen zeigten unter Beachtung der Basislinienpermeabilität eine hohe Übereinstimmung, so dass die Permeabilität von Losartan und EXP 3174 im Weiteren unter Zusatz von Inhibitoren gemessen werden konnte.

Gleichzeitige Perfusionen von Losartan und EXP 3174 wiesen keine Interaktionen zwischen den Komponenten auf, denn die effektiven intestinalen Permeabilitäten, die aus einer 2-Stufen-Perfusion resultierten, ergaben im Vergleich zur Einfachperfusion keine abweichenden Werte. Im Vergleich mit dem Metaboliten wurden, wie auch schon in den In-vitro-Transportstudien, für Losartan höhere

Permeabilitäten im Ileum und Jejunum gefunden, wobei aber bei beiden Verbindungen die ileale Permeabilität höher war als die jejunale, was bedingt sein kann durch die Abnahme der P-GP- und CYP3A4-Konzentration im Darm (Guo 2002).

4.2.2.2. Transporthemmung

Seit langem ist bekannt, dass Verapamil den P-GP-vermittelten Transport dosisabhängig hemmt (Pauli-Magnus 2000) und in der Chemotherapie als MDR-modifizierende Substanz eingesetzt wird. Setzt man Verapamil dem Perfusat zu, so konnte ein Anstieg der Permeabilität von Losartan und EXP 3174 erreicht werden, was auf einen P-GP-vermittelten Transport schließen lässt. Jedoch - wie auch schon beim Talinolol (Hanafy 2001) beobachtet - fiel der Anstieg geringer aus als erwartet. Neben der sehr hohen Lipophilie wird als mögliche Ursache auch der ausgeprägte Metabolismus des Verapamils durch die CYP-Isoenzymfamilie (Bioverfügbarkeit 22%) angenommen, obwohl die Metaboliten des Verapamils selbst als Substrate bzw. Inhibitoren des P-GP einzustufen sind (Neuhoff 2000, Pauli-Magnus 2000).

Um die P-GP-Abhängigkeit des Transportes zu bestätigen, wurde dem Perfusat Vinblastin zugesetzt, das (wie Bindungsstudien ergaben) ebenso ein potenter Hemmer des P-GP ist (Döppenschmitt 1998). Hier konnte sowohl für Losartan als auch für EXP 3174 ein Permeabilitätsanstieg nachgewiesen werden, der, wie auch schon beim Verapamil, für Losartan stärker ausgeprägt war.

Nicht nur P-GP-vermittelte Prozesse führen zur intestinalen Sekretion, ebenso kann dafür auch das multidrug resistance-associated protein (MRP) verantwortlich sein. Da sehr häufig eine identifizierte Überschneidung zwischen P-GP- und MRP-Substraten gefunden wird, verwendeten wir als MRP1-Inhibitor Calcein (Hilgendorf 1999, Versantvoort 1995). Es zeigte sich auch hier für beide untersuchten Substanzen ein Permeabilitätsanstieg.

Im physiologischen pH-Wert liegen die Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten, die eine sehr hohe Proteinbindung (Christ 1995) besitzen, zu einem hohen Prozentsatz als Anionen vor (Csajka 1997) und ein Teil der applizierten Dosis wird unverändert im Urin ausgeschieden. Daraus resultiert die Annahme, dass diese Moleküle auch über einen organischen Anionentransporter sezerniert werden (Edwards 1999).

Da Untersuchungen von Gotoh (2000) bestätigt hatten, dass der aktive sekretorische Anionentransporter MRP2/cMOAT vorwiegend in der Leber, aber auch im Darm zu finden ist, wurden in den hier beschriebenen Perfusionsstudien mit Probenecid und Indometacin klassische Inhibitoren des organischen Anionen- und cMOAT-Transporters eingesetzt. Sowohl für Losartan als auch für EXP 3174 konnte nach Zusatz beider Inhibitoren im Perfusat ein Anstieg der intestinalen Permeabilität beobachtet werden, der beim Losartan deutlicher ausgeprägt war als bei seinem Metaboliten. Die hier gefundene Erhöhung der Permeabilität steht im Einklang mit den Untersuchungen von Edwards (1999), der nachwies, dass das Ausmaß der Sekretion von Losartan in den proximalen Tubulus vergleichbar mit der des para-Aminohippurates ist, einer Sättigung unterliegt und durch Probenecid gehemmt werden kann.

Als Monocarbonsäure wäre es auch für den aktiven Metaboliten des Losartan möglich, das intestinale Epithel als Substrat des Monocarbonsäuretransporters mit Hilfe der erleichterten Diffusion auf dem transzellulären Weg zu überwinden. In Untersuchungen von Tamai (1999) konnte nachgewiesen werden, dass der intestinale Transport von Benzoesäure MCT1-vermittelt und sättigbar ist. Mit einem Benzoesäurezusatz im Perfusat konnte beim Losartan keine Veränderung der intestinalen Permeabilität nachgewiesen werden, wohl aber für die Carbonsäure EXP 3174.

Untersuchungen von Leisen (2002 (2)) zeigten, dass Taurin- und Coffeinzusätze im Perfusat eine Veränderung der intestinalen Permeabilität von Baclofen und Gabapentin bewirken, die aktiv durch den Aminosäuretransporter absorbiert werden (Tsuji 1996). Für die Angiotensin-II-Antagonisten wurde beim Taurin eine unbedeutende Absenkung der Permeabilität gefunden, die nicht signifikant war. Coffeinzusätze führten sowohl beim Losartan als auch beim EXP 3174 zu einem verminderten Transport, der wahrscheinlich auf die vasokonstriktorische Eigenschaft des Coffeins zurückzuführen ist (Okuno 2001).

4.2.2.3. Zirkadiane Veränderungen in der Permeabilität

Naheliegender war es auch, die Resultate der Perfusionsstudien dahingehend zu bestätigen, ob die Aktivität der Transporter einen Einfluss auf die Hemmung der Sekretion hat. Da Ratten als Versuchstiere

nicht wie der Mensch tagaktiv sind, sondern nachtaktiv, war denkbar, dass die Aktivität der Transporter, hier für das P-GP, in der Dunkelphase (Nacht) im Vergleich zum Tag verändert sein könnte.

Die intestinale Permeabilität des Losartans, die durch Coperfusion mit EXP 3174 nicht beeinflussbar war, war in beiden Darmsegmenten in der Nacht geringer als am Tag, was auf eine verminderte Aktivität des P-GP am Tag schließen lässt. Da die Permeabilität des Losartans durch Coperfusion mit potenten P-GP-Inhibitoren (Verapamil, Vinblastin und PSC 833) erhöht wird, konnte auch mit diesem experimentellen Design bestätigt werden. Zusätzlich war ersichtlich, dass das Ausmaß der Sekretionshemmung in der Nacht erhöht war, was auf eine verstärkte Transporteraktivität schließen lässt.

Kontrollperfusionsen mit dem P-GP-Modellsubstrat Talinolol bestätigten die mit Losartan ermittelten Ergebnisse, denn auch hier wurde in Coperfusionen mit P-GP-Inhibitoren (Vinblastin, Rifampicin und PSC 833) in der Nacht ein verstärktes Ansteigen der Permeabilität beobachtet, ebenso konnte nachgewiesen werden, dass Losartan einen Effekt auf die intestinale Permeabilität des P-GP-Substrates Talinolol hat und dessen Permeabilität erhöht wird bei einem Losartanzusatz im Perfusat. Dies gilt als direkter Nachweis dafür, dass beide Substanzen über denselben Transporter sezerniert werden.

4.3. Kinetische Studien am Ganztier

In bereits durchgeführten Kinetik- und Gewebeverteilungsstudien mit Losartan wurden nach chronischer Gabe im Blut, Herz und Lunge gegenüber der Einmalgabe wesentlich geringere und im Darm höhere Konzentrationen des Losartanmetaboliten EXP 3174 gefunden, während die Konzentrationen des Losartans weitestgehend konstant blieben (Soldner 1996 (1)).

Auf der Basis, dass Losartan *in vitro* als Substrat für das Cytochrom-P450-Isoenzym CYP3A4 und CYP2C9 bestätigt wurde (Stearns 1995, Yasar 2001), wurde angenommen, dass ein verstärkter Metabolismus in der Darmwand in Kombination mit einer erhöhten intestinalen Sekretion des Metaboliten über P-Glykoprotein-ähnliche Transporter in das Darmlumen stattfindet. Eine orientierende Studie zur biliären Ausscheidung von Losartan und seinem Metaboliten (Dressler 1997) zeigte, dass nach peroraler Applikation der Muttersubstanz innerhalb von 10 Stunden 12% der Dosis in der Galle ausgeschieden werden und die kumulative Ausscheidungskurve danach ein Plateau erreicht. Im Falle des EXP 3174 konnte, wohl verursacht durch die höhere Halbwertszeit des Metaboliten, bis 10 Stunden nach Losartangabe ein steiler Anstieg beobachtet werden, der zeigt, dass rund 20% der Dosis als EXP 3174 biliär ausgeschieden werden. Die biliäre Clearance für EXP 3174 konnte nur über eine intravenöse Applikation des Metaboliten selbst ermittelt werden. Mit den Kinetikstudien dieser Arbeit wurden die fehlenden kinetischen Parameter vervollständigt, sowie zusätzlich das pharmakokinetische Profil des Metaboliten nach separater Applikation untersucht.

4.3.1. Charakterisierung relevanter kinetischer Parameter

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurden nach separater i.v.-Applikation von Losartan um den Faktor 2 höhere terminale Halbwertszeiten für den Metaboliten gefunden (Losartan: 530 Minuten, EXP 3174: 1001 Minuten), die jedoch nach i.v.-Gabe von EXP 3174 selbst bedeutend niedrigere Werte von 203 Minuten annahmen. Hingegen wurden keine Unterschiede in der terminalen Halbwertszeit für EXP 3174 nach peroraler Dosierung von Losartan und von EXP 3174 gefunden, allgemein lagen bei dieser Applikationsart die Werte für beide Substanzen im gleichen Bereich, Losartan 537 Minuten, EXP 3174 565 Minuten und nach EXP 3174-Gabe 528 Minuten. C_{max} und t_{max} waren für EXP 3174 nach dessen Dosierung geringer als nach Losartangabe.

Aus den erhaltenen Blut-Konzentrations-Zeit-Kurven nach separater Applikation der Substanzen wurde für Losartan eine totale *In-vivo*-Clearance von 1,7 ml/min gefunden und von 5,9 ml/min für EXP 3174. Die systemische Verfügbarkeit nach peroraler Gabe betrug bei Losartan im Mittel 33% und 19% bei EXP 3174. In beiden Studien wurden höhere Bioverfügbarkeitswerte für Versuchstiere mit Gallengangsdrainage als für nichtkanülierte gefunden, was auf einen enterohepatischen Kreislauf von EXP 3174 schließen lässt.

Basierend auf der biliären Gesamtausscheidung von 5,3% der Dosis nach intravenöser und 2,2% nach peroraler Losartangabe wurde bei den kanülierten Ratten eine hepatische Clearance von 0,1 ml/min für Losartan ermittelt. Resultierend aus den früheren Untersuchungen mit Mikrosomen (Dressler 1997) und

den aus In-vivo-Studien erhaltenen Daten ergab sich für Losartan in Ratten eine systemische Gesamtclearance von 1,7 ml/min, die sich aus 70% hepato-metabolischen (1,2 ml/min), 18% hepato-sekretorischen (0,4 ml/min) und 12% aus nicht hepatisch-metabolischen Eliminationsprozessen (0,1 ml/min) zusammensetzt.

Nach i.v.-Applikation des aktiven Metaboliten wurden 35% und nach p.o.-Gabe 3,4% in der Galle ausgeschieden und ergaben eine hepatisch-sekretorische Clearance von 0,1 ml/min. Obwohl in den Darmgewebepräparationen (Dressler 1997) kein EXP 3174 gebildet wurde und auch die intestinale Permeabilität von EXP gering ist (Ribadeneira 1996), ist anzunehmen, dass hohe intraluminale und Darmwandkonzentrationen des aktiven Metaboliten das Resultat einer hohen biliären Sekretion mit einer nur teilweisen Reabsorption sind. Die kürzere Halbwertszeit von EXP 3174 nach i.v.-Gabe in den kanülierten Ratten bestätigt auch die Hypothese, dass die Absorption oder Reabsorption der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Kinetik des Metaboliten ist.

Die erhaltenen Daten zur totalen und zur hepatischen Clearance verdeutlichen, dass ein Großteil der Clearance von Losartan durch hepatische Prozesse erklärt werden kann. Allerdings ist bekannt, dass die beiden vorwiegend für den Abbau verantwortlichen CYP-Isoformen (CYP3A4 und CYP2C9, (Stearns 1992, 1995; Yasar 2001)) auch außerhalb der Leber in einem nennenswerten Ausmaß nachweisbar sind, so dass metabolische Clearanceprozesse nicht allein auf die Leber begrenzt sein müssen.

Die Vermutung, dass an der geringen Bioverfügbarkeit des Losartans auch intestinale Sekretionsprozesse über P-Glykoprotein-ähnliche Transporter beteiligt sein können, konnte in dieser In-vivo-Studie dahingehend bekräftigt werden, dass sowohl für Losartan als auch für EXP 3174 die biliäre Clearance höher war als der Gallefluss, was auf einen aktiven Carrier-vermittelten Transport schließen lässt.

Des weiteren wurde vor einiger Zeit auch gefunden, dass sowohl CYP3A4 als auch P-GP durch die gleichen Verbindungen hemm- oder induzierbar sind (Schütz 1996), und es ist bekannt, dass beide in hohen Konzentrationen in den Enterozyten des GIT (dem Hauptabsorptionsort von oral applizierten Substanzen) exprimiert werden.

Durch ihre Lokalisation im Darm, der Überlappung ihrer Substratspezifität und z.T. der geringen Bioverfügbarkeit von CYP3A4- und P-GP-Substraten (Wacher 1995) ist die Bedeutung von CYP3A4 und P-GP in der Limitierung der oralen Verfügbarkeit offensichtlich (Zhang 2001). So kann z.B. mit Rifampicin sowohl eine Induktion von CYP3A4 aber auch von P-GP erreicht werden. Asghar (2002) wies nach, dass eine Coexpression von enterozytärem P-GP und CYP3A4 stattfindet und P-GP die intrazelluläre Konzentration von CYP3A4-Induktoren und somit das Ausmaß der CYP3A-Induktion limitieren kann (Zhang 2001). Die Substanz gelangt durch passive Diffusion in die Enterozyten, wird dort durch CYP3A4 metabolisiert und als Substrat des aktiven Countertransporters P-GP zurück ins Darmlumen sezerniert, wobei die passive Diffusion und der Countertransport einen kontinuierlichen Substanzzyklus zwischen dem Enterozyten und dem Darmlumen ermöglichen. Die Menge des intakten Substanzmoleküls, die in den systemischen Kreislauf eintreten kann, wird demnach durch den CYP3A-vermittelten Metabolismus und P-GP-vermittelten Countertransport in den Enterozyten limitiert und führt zu einer Senkung der oralen Verfügbarkeit (Benet 1999).

4.3.2. Einfluss des P-GP-Inhibitors Verapamil auf die Absorption und Disposition von Losartan und EXP 3174

Wie in der Multidrug-Resistenz, so sollte auch im GIT der Einsatz von Inhibitoren zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit führen. Eine gleichzeitige Gabe von Verapamil sollte durch P-GP-Hemmung zu einer Erhöhung der absorbierten Stoffmenge durch Reduktion des auswärts gerichteten Transportes führen.

Basierend auf den Ergebnissen der In-vitro- und In-situ-Studien, die einen eindeutigen Einfluss von P-GP im Transportverhalten von Losartan und EXP 3174 erkennen lassen, sollte in vivo getestet werden, ob bei Coadministration der Angiotensin-II-Antagonisten mit dem potenten P-GP-Inhibitor Verapamil die Gewebekonzentrationen gesteigert werden können bzw. eine Veränderung in der Verteilung sichtbar wird.

Die Blut-Konzentrations-Zeit-Profile von Losartan und EXP 3174, die nach Losartan- bzw. EXP 3174-Applikation erhalten wurden, zeigten z.T. geringfügige Anstiege bei Coadministration mit Verapamil. Lediglich bei Losartan wurde ein Anstieg der Bioverfügbarkeit um 7% beobachtet, während beim

EXP 3174 die gleichzeitige Gabe von Verapamil ohne Einfluss blieb. Sowohl nach intravenöser als auch nach peroraler Gabe von Losartan, aber auch von EXP 3174, wurden in der Leber die höchsten Konzentrationen gefunden und die Gewebe-Blut-Verhältnisse nahmen mit Verapamil höhere Werte an. Wenn EXP 3174 selbst peroral appliziert wurde - und nicht die Muttersubstanz Losartan - zeigte sich kein Effekt auf die Blutkonzentrationen und nur eine geringe Beeinflussung der Leberkonzentrationen durch Verapamil.

Ein direkter Vergleich der in dieser Studie erhaltenen Blutspiegelwerte mit der Kinetikstudie ist nicht möglich, da mit verschiedenen Rattenstämmen (Kinetik: Sprague Dawley, Verteilung: White Wistar) gearbeitet wurde. Bedingt durch die unterschiedliche Sensitivität der jeweiligen Stämme ist es nur möglich, eine Tendenz abzuschätzen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass eine Verapamil-Comedikation zwar die Gewebekonzentrationen geringfügig erhöhte, aber zu keiner Veränderung der Gewebeverteilung führte. Hauptsächlich Verteilungsorte neben der Leber sind Blut und Niere, erst dann der Darm, wobei im Jejunum höhere Werte gefunden wurden als im Ileum.

4.4. Prädiktiver Wert von In-vitro-Studien

Im Rahmen der Arbeit wurden für die beiden Verbindungen, die im Zentrum des Interesses standen, Losartan und sein auch wirksamer Hauptmetabolit EXP 3174 (z.T. vergleichend mit anderen Modellsubstanzen), Affinitäts- bzw. Transportparameter an unterschiedlichen experimentellen Modellen ermittelt.

Für Losartan ergaben sich im Rahmen von Hemmstudien Hinweise dafür, dass für das Permeationsverhalten durch Membranen nicht allein das P-Glykoprotein verantwortlich ist, sondern auch das multidrug resistance-associated Protein (MRP) einen Einfluss hat. Bei seinem Metaboliten spielen sowohl P-GP, MRP und der Monocarboxsäuretransporter eine Rolle.

Unter der Annahme, dass zwei Liganden an einer Bindungsstelle des Transporters sich gegenseitig beeinflussen, wurde eine Interaktionsstudie mit Verapamil durchgeführt, das bei Permeationsversuchen mit P-GP-exprimierenden Caco-2-Zellmonolayern einen seiner hohen P-GP-Affinität entsprechenden Sekretions-hemmenden Effekt für andere P-GP-Substrate zeigte. Hieraus wäre bei gleichzeitiger peroraler Applikation einer entsprechenden Dosis eine deutlich erhöhte p.o.-Bioverfügbarkeit für Losartan abzuleiten.

Allerdings deutet schon der geringe Effekt von Verapamil bei den In-situ-Perfusionen des Rattendarms darauf hin, dass in vivo der Einfluss auf die Bioverfügbarkeit nach p.o.-Gabe geringer sein könnte als im einfachen Caco-2-Modell. Diese Befunde - wie auch die von Hilgendorf (1999) und Hanafy (2001) - lassen den Schluss zu, dass zwar über Bindungs- und Transportstudien eine gute Prädiktion des In-vivo-Absorptionsverhaltens möglich ist, eine Vorhersage von Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen bei der Absorption allerdings kaum möglich ist. Substanzen mit einer hohen intestinalen Permeabilität und guter/sehr guter passiver Permeabilität werden möglicherweise so schnell absorbiert, dass die Interaktion mit Transportern nur noch von untergeordneter Bedeutung ist und eine auf einer kompetitiven Sekretionshemmung beruhende Bioverfügbarkeitserhöhung nicht signifikant ist.

Somit hat jede der in die Arbeit mitaufgenommenen Techniken in der Aufklärung von Mechanismen ihre Bedeutung:

- Zunahme des prädiktiven Wertes für In-vivo-Verhältnisse
- ↓
- ⇒ Affinitätsstudien dienen dem Nachweis der Bindung an bestimmte Bindungsstellen und Struktur-Affinitäts-Untersuchungen.
 - ⇒ Transportstudien mit Zellmonolayern und isolierten Gewebeschichten dienen der Vorhersage der Absorbierbarkeit von Arzneistoffen.
 - ⇒ In-situ-Perfusionsstudien am Rattendarm, ursprünglich ebenfalls ein System, um die Absorbierbarkeit von Substanzen zu evaluieren, können als 2- bis 3-Stufen-Perfusionen zur Testung von Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen herangezogen werden. Die derzeit vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass dieses Modell den besten prädiktiven Wert hat für die Vorhersage von Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen auf Absorptionsebene.

5. Materialien und Methoden

5.1. In-vitro-Untersuchungen an Caco-2-Zellen

5.1.1. Radioligandenbindungsassay

5.1.1.1. Chemikalien und Geräte

5.1.1.1.1. Chemikalien

Alprenolol	(RS)-1-(2-Allylphenoxy)-3-isopropylamino-2-propanol Sigma, St. Louis, MO, USA
Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Antibiotika	Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml, 10000 µg/ml), Biochrom KG, Berlin, Deutschland
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) mit stabilem Glutamin, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EXP 3174	2-Butyl-4-chlor-1-{4-[2-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl}imidazol-5-carbonsäure Du Pont Merck, Merck Pharmaceuticals, Wilmington, Delaware, USA
FBS	Fötales bovines Serum (Fetal bovine serum (FBS)), Biochrom KG, Berlin, Deutschland
HBSS	Hank's Salzlösung (Hank's balanced salt solution (HBSS)) ohne Phenolrot, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Losartan	2-Butyl-4-chlor-1-{4-[2-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl}imidazol-5-methanol Du Pont Merck, Merck Pharmaceuticals, Wilmington, Delaware, USA
L- α -Lysophosphatidylcholin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
NEA	Nichtessentielle Aminosäuren (Non essential amino acids (NEA)), Biochrom KG, Berlin, Deutschland
PBS-Puffer	Phosphatpuffer (Phosphate buffered saline (PBS)) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Rotiszint 22	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Talinolol	(RS)-1-{4-[3-(<i>tert</i> -Butylamino)-2-hydroxypropoxy]phenyl}-3-cyclohexylurea AWD, Radebeul, Deutschland
³ H-Talinolol	Kix, Volxheim (www.isotopes.de), Deutschland, (55 mCi/mmol)
Trypsin/EDTA	Trypsin/EDTA (0,25%; 0,02%), Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Verapamil	(RS)-2-Isopropyl-2,8-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-6-azaoctannitril Verapamil-Hydrochlorid, Sigma, St. Louis, USA

Vinblastin	[3aR-[3a α ,4 β ,5 β ,5a β ,9(3R*,5S*,7R*,9S*),10bR*,13a α]]-Methyl-4-(acetyloxy)-3a-ethyl-9-[5ethyl-1,4,5,6,7,8,9,10-octahydro-5-hydroxy-9-(methoxy-carbonyl)2H-3,7-methanoazacyclo-undecino[5,4-b]indol-9-yl]-3a,4,5,5a,6,11,12,13a-octahydro-5-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-1H-indolizino[8,1-cd]carbazol-5-carboxylat Vinblastinsulfat, Velbe™, Lilly, Bad Homburg, Deutschland
------------	---

5.1.1.1.2. Geräte

Counter	Flüssigszintillationszähler, Beckman Coulter, Unterschleissheim, Deutschland
Datenanalyse	Windows 98, Microsoft Excel 97, Microsoft Corporation, USA Microcal Origin™, Version 6.0, Microcal Software, Northampton, USA
Destillation	Destamat, Bi 18 E, Heraeus, Hanau, Deutschland
Filter	GF/C Filter, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland
Hämocytometer	Thoma-Zählkammer, Roth
Harvester	Brandel Harvester M-24R, Biomedical Research & Development Laboratories, Gaithersburg, USA
Inkubator	CO ₂ -Inkubator MCO 17 AI, Sanyo, Vertrieb durch MS-Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
pH-Meter	pH 538 MultiCal, WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Platten	MicroWell™ Plate, Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Schüttler	IKA™-Schüttler MTS 2, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Zellkulturflaschen	Zellkulturflaschen mit Filterverschluss, 75 cm ² , Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturröhrchen	PP-Röhrchen, steril, 15 und 50 ml, Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5804R, Hamburg, Deutschland

5.1.1.2. Caco-2-Zellpräparation

Die humane Coloncarzinom-Zelllinie Caco-2 wurde aus einem primären Adenocoloncarzinom kultiviert, das einem 74-jährigen Patienten entfernt wurde. In der Kultur entwickelten sich die ursprünglichen Zellen aus undifferenzierten Zellen über ein Zwischenstadium zu polarisierten, säulenförmigen Enterozyten. Einige Tage nach dem Erreichen der Konfluenz bildeten sich die Colonozytenproteine zurück und die Konzentration der Enterozytenproteine nahm zu. Die ausdifferenzierten Zellen zeigten dabei die für Dünndarmgewebe typischen Mikrovilli, sowie eine polarisierte Verteilung der integralen Membranproteine der Bürstensaumenzyme, so dass sie damit ein Stück des Dünndarmgewebes simulierten. Ebenso formten sie flüssigkeitsgefüllte Halbzysten (Domes), welche typisch sind für ein transportfähiges Epithel. Weiterhin wurde in früheren Untersuchungen gezeigt, dass Caco-2-Zellen auch auf Polycarbonatmembranen eine dem intestinalen Epithel in Zellmorphologie und Polarität entsprechende Zellmonoschicht formen, die für Transportuntersuchungen einsetzbar ist. Sie enthält die im Intestinum physiologisch vorkommenden Transportsysteme, wie z.B. P-GP, OCT und PepT1. Beim Vergleich unterschiedlicher Passagenummern wurde festgestellt, dass Zellen mit höheren Passagenummern eine höhere Proliferationsrate und einen größeren TEER (Transepithelialen elektrischen Widerstand, transepithelial electrical resistance), intra- und interzelluläre Lumina aufweisen und zum Teil zur Bildung von multiplen Zellschichten neigen. Diese morphologischen und physiologischen Unterschiede hatten aber keinen Einfluss auf die Permeationsrate des parazellulären Permeationsmarkers Mannitol, der in Transportstudien zur Abschätzung der Integrität der Monolayer genutzt wird. Die Caco-2-Zelllinie wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl zu Bindungsstudien (Kapitel 3.1.1.) als auch zu Transportuntersuchungen (Kapitel 3.1.2.) eingesetzt.

Für die Durchführung des Radioligandenbindungsassays wurden Caco-2-Zellen der Passagen 58-61 verwendet. Sie wuchsen in einem Kulturmedium bestehend aus: Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) mit stabilem Glutamin, ergänzt mit 20% Fötalem bovinem Serum (Fetal bovine serum (FBS)), 1% Nichtessentiellen Aminosäuren (Non essential amino acids (NEA)), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin. Zur Induktion der P-GP-Expression enthielt das Kulturmedium 10 nM Vinblastinsulfat.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm² Wachstumsfläche) mit Filterverschlüssen in einer Dichte von 5 Millionen je Flasche ausgesät und in einem Inkubator bei 37°C, 95% Luft und 5% CO₂ mit 100% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Etwa 7-10 Tage nach Aussaat kamen die Zellen für das Bindungsassay zum Einsatz.

Zur Herstellung der im Bindungsassay verwendeten Zellpräparation wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellmonolayer zweimal mit 5 ml PBS-Puffer (Phosphatpuffer) gewaschen. Die Zellmonolayer wurden mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,25%; 0,02%) trypsinisiert und nach 30 Minuten wieder in 18 ml Kulturmedium aufgenommen, um die Reaktion zu beenden. Nach Ermittlung der Zellzahl (Hämozytometer (Thoma-Zählkammer)) wurde das Medium durch Zentrifugation (10 min; 23°C; 1200 Upm) entfernt und die Zellen einmal mit 20 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 0,01%-iger L- α -Lysophosphatidylcholinlösung resuspendiert, auf eine Konzentration von 1 Million Zellen/125 µl Zellpräparation (well) eingestellt und sofort im Bindungsassay verwendet.

5.1.1.3. Bindungsassay

Die Quantifizierung von Substanzaffinitäten in verschiedenen Geweben zum energieabhängigen Transporter P-GP unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen ist in der letzten Zeit immer mehr von Interesse. Vorteile von schnellen Testsystemen zur P-GP-Affinitätsbestimmung sind nicht allein in der Suche nach P-GP-Modulatoren in der Krebsforschung zu erwarten, sondern auch für die Charakterisierung einer Substanz hinsichtlich der Korrelation ihrer Affinität zur Bindungsstelle am P-GP und verschiedenen pharmakokinetischen Charakteristiken, die z.B. die intestinale Permeabilität und Sekretion, sowie Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke einschließen. Das verwendete Bindungsassay basiert auf der kompetitiven Bindung und Verdrängung von P-GP-Liganden.

Das Radioligandenbindungsassay wurde in 96-well-Platten durchgeführt. Als Matrix zum Lösen der Testsubstanzen diente ein Inkubationspuffer pH 7,0, der aus Hank's Salzlösung (HBSS) bestand, die mit 10 mM Morpholinoethansulfonsäure (MES) gepuffert war. Die Einstellung des pH-Wertes des Inkubationspuffers auf 7,0, sowie der unterschiedlichen Testlösungen erfolgte mit Salzsäure (1 M).

Jeder Inkubationsansatz enthielt 100 µl der Substanzlösung in definierter Konzentration, 25 µl ³H-Talinolol-Radioligandenlösung und 125 µl Zellsuspension (unter 5.1.1.2 beschrieben).

Zur Bestimmung der verwendeten Testsubstanzen wurden Verdrängungsexperimente mit einer Radioligandkonzentration von 1 µM Talinolol (20% ³H-Talinolol) durchgeführt.

Jede Probe wurde unter gleichmäßigem Schütteln (1200 Upm/min) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem Brandel-Zell-Harvester erfolgte über eine Vakuumfiltration z.B. durch Glasfaserfilter die Abtrennung des nicht gebundenen Radioligandenanteils von dem an P-GP gebundenen Anteil. Jeder Filter wurde mit 5 ml eiskalter isotonischer Kochsalzlösung (0,9%-ige NaCl-Lösung) gewaschen und in 4 ml Szintillationsflüssigkeit aufgenommen. Die Bestimmung der noch auf dem Filter vorhandenen Radioaktivität wurde in einem Flüssigszintillationszähler durchgeführt.

Mit Hilfe des Radioligandenbindungsassays wurden

- ⇒ Lösungsmiteinflüsse mit und ohne Zusatz eines RL-Bindungsinhibitors,
- ⇒ der Einfluss des pH-Wertes auf die Verdrängung von ³H-Talinolol und
- ⇒ die Bestimmung der P-GP-Affinität von Testsubstanzen durch Verdrängung von ³H-Talinolol untersucht.

Um den Einfluss von Lösungsmitteln, die zur Verbesserung der Löslichkeit der Testsubstanzen zugesetzt wurden, beurteilen zu können, wurden Verdrängungsexperimente mit häufig verwendeten Lösungsmitteln (Acetonitril, DMSO, Ethanol und Methanol) mit und ohne Zusatz eines RL-Bindungsinhibitors durchgeführt. Dabei wurden in Prä-Screeningversuchen 4 Konzentrationen des jeweiligen Lösungsmittels (20, 2, 0,2 und 0,02% (v/v) Lösungsmittel) im HBSS-Puffer pH 7,0 eingesetzt, wobei die Aufnahme einer kompletten Verdrängungskurve für Acetonitril, DMSO und Ethanol mit den im

Kapitel A.1.A.I.a-d. angegebenen Konzentrationen ohne Zusatz eines RL-Bindungsinhibitors durchgeführt wurde. Unter Zusatz des RL-Bindungsinhibitors Talinolol (Konzentrationen 4, 0,4, 0,04 und 0,004 mM Talinolol) wurden mit Lösungsmittelkonzentrationen von 20, 2, 0,2 und 0,02% (v/v) im HBSS-Puffer pH 7,0 der Einfluss auf die Verdrängung von ³H-Talinolol untersucht.

Um die Auswirkungen von pH-Wertverschiebungen in den sauren Bereich abschätzen zu können, wurde der pH-Wert des Inkubationspuffers durch Zugabe von Salzsäure (1 M) von 5,5 bis 7,0 variiert ohne Zusatz eines RL-Bindungsinhibitors. Der pH-Bereich von 2,0-7,0 des Inkubationspuffers, dessen Einstellung mit 1 M Salzsäure erfolgte, wurde unter Zusatz des RL-Bindungsinhibitors Talinolol (Konzentration 4 mM) getestet.

Neben Standardsubstanzen, wie Alprenolol (30-0 mM), Talinolol (2,5-0 mM) und Verapamil (5-0 mM) wurden auch mit den Angiotensin-II-Antagonisten Losartan und EXP 3174 (4-0 mM) Verdrängungsexperimente mit 12 verschiedenen Konzentrationen je Substanz durchgeführt (siehe Kapitel A.1.B.).

5.1.1.4. Kalkulationen

Zur Bestimmung der P-GP-Affinität von nichtgelabelten Testsubstanzen, wurde die Verdrängung des Radioliganden ³H-Talinolol mit zunehmenden Konzentrationen der zu bestimmenden Substanz ermittelt. Die Kurvenanpassungen der Verdrängungsexperimente wurden nach folgender Gleichung mit Microcal Origin™ Version 6.0 durchgeführt:

$$y = y_0 + \frac{a \cdot x^b}{c^b + x^b}$$

y ₀	Verdrängung bei minimaler Substanzkonzentration (0%)
A	Verdrängung bei maximaler Substanzkonzentration (100%)
B	Hill-Koeffizient
C	IC ₅₀ -Wert [μM]

Spezifische Bindung [%] = Totale Bindung - Nichtspezifische Bindung

5.1.2. Transportstudien mit Caco-2-Zellmonolayern

5.1.2.1. Chemikalien und Geräte

5.1.2.1.1. Chemikalien

Antibiotika	Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml, 10000 μg/ml), Gibco BRL Life Technologies, Paisley, England
Atenolol	(RS)-2-[4-(2-Hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)phenyl]acetamid Sigma, St. Louis, MO, USA
³ H-Atenolol	Dept. Medizinische Chemie, Astra Hässle AB, Mölndal, Schweden (12,9 kBq/nmol)
R/S-Baclofen	(RS)-4-Amino-3-(4-chlorphenyl)buttersäure Ciba-Geigy, Basel, Schweiz
¹⁴ C-R/S-Baclofen	Dept. Medizinische Chemie, Astra Hässle AB, Mölndal, Schweden (2,2 kBq/nmol)
S-Baclofen	(S)-4-Amino-3-(4-chlorphenyl)buttersäure Ciba-Geigy, Basel, Schweiz
³ H-(S)-Baclofen	Dept. Medizinische Chemie, Astra Hässle AB, Mölndal, Schweden (31,6 Ci/mmol)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) ohne Glutamin, Gibco BRL Life Technologies, Paisely, England
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Sigma, Malmö, Schweden

EXP 3174	2-Butyl-4-chlor-1-{4-[2-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl}imidazol-5-carbonsäure Du Pont Merck, Merck Pharmaceuticals, Wilmington, Delaware, USA
FBS	Fötales bovines Serum (Fetal bovine serum (FBS)), Gibco BRL Life Technologies, Paisley, England
L-Glutamin	200 mM, Lösung, Gibco BRL Life Technologies, Paisley, England
Gly-Pro	Sigma, St. Louis, MO, USA
³ H-Gly-Pro	Dept. Medizinische Chemie, Astra Hässle AB, Mölndal, Schweden
HBSS	Hank's Salzlösung (Hank's balanced salt solution (HBSS)) ohne Phenolrot, Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, England
Losartan	2-Butyl-4-chlor-1-{4-[2-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl}imidazol-5-methanol Du Pont Merck, Merck Pharmaceuticals, Wilmington, Delaware, USA
D-Mannitol	Sigma, St. Louis, MO, USA
¹⁴ C-D-Mannitol	NEN, Boston, MA, USA (1,9 GBq/mmol)
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland
Metoprolol	(<i>RS</i>)-1-Isopropylamino-3-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]-2-propanol Sigma, St. Louis, MO, USA
³ H-Metoprolol	Dept. Medizinische Chemie, Astra Hässle AB, Mölndal, Schweden
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
NEA	Nichtessentielle Aminosäuren (Non essential amino acids (NEA)), Gibco BRL Life Technologies, Paisley, England
OptiPhase HiSafe3	Wallac Scintillation Products, Wallac, Turku, Finnland
PBS-Puffer	Phosphatpuffer (Phosphate buffered saline (PBS)) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Gibco BRL Life Technologies, Paisley, England
L-Phenylalanin	(<i>S</i>)-2-Amino-3-phenylpropionsäure Sigma, St. Louis, MO, USA
¹⁴ C-Phenylalanin	NEN, Boston, MA, USA (18,7 GBq/mmol)
Propranolol	(<i>RS</i>)-1-Isopropylamino-3-(1-naphthyloxy)-2-propanol Sigma, St. Louis, MO, USA
³ H-Propranolol	NEN, Boston, MA, USA (21 Ci/mmol)
Talinolol	(<i>RS</i>)-1-{4-[3-(<i>tert</i> -Butylamino)-2-hydroxypropoxy]phenyl}-3-cyclohexylurea Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul, Deutschland
³ H-Talinolol	Kix, Volxheim (www.isotopes.de), Deutschland, (55 mCi/mmol)
Trypsin	Gibco BRL Life Technologies, Paisley, England
Verapamil	(<i>RS</i>)-2-Isopropyl-2,8-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-6-azaoctannitril Verapamil-Hydrochlorid, Sigma, St. Louis, USA

5.1.2.1.2. Geräte

Counter	Flüssigszintillationszähler, Waalac, WinSpectral 1414 Liquid Scintillation Systems, Väsby, Schweden
Datenanalyse	Windows 98, Microsoft Excel 97, Microsoft Corporation, USA
Elektroden	EVOM Epithelial Voltohmmeter, World Precision Instruments, Sarasota, USA Chopstick: STX-2 Electrode, World Precision Instruments, Sarasota, USA

Hämocytometer	Bürker-Zählkammer, Hirschmann EM Techcolor Bürker
Inkubator	Transportversuche: Stuart Scientific Incubator S.I. 60, England Zellkultivierung: Forma CO ₂ -Inkubator, Model 3164, Forma Scientific Inc., Marietta, Ohio, USA
Kulturplatten	Transwell-Platten mit 6 (1,13 cm ²) bzw. 12 (4,71 cm ²) wells mit Polycarbonatmembran, 0,4 µm Porengröße, Transwell, Costar, Corning, NY, USA
Mikroskop	Nikon TMS, Nikon, Melville, NY, USA Olympus IMT-2, Olympus, Lake Success, NY, USA
Schüttler	Orbital Shaker SO1, Stuart Scientific Company Limited, England
Sicherheitswerkbank	Holten LamAir HBB 2448, Heto Holten, Dänemark
Zentrifuge	Hettich Rotanta 96, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zellkulturmaterial	KeboLab, Göteborg, Schweden

5.1.2.2. Zellkultur

Für die Transportuntersuchungen wurden Caco-2-Zellen unterschiedlicher Passagen P30 und P79 (P30/31: Astra Zeneca und P77/79: J. Biber, Zürich) verwendet, die in einer Atmosphäre von 5% CO₂, bei einer relativen Feuchtigkeit von 90% und bei 37°C kultiviert wurden. Abhängig von den Passagenummern der Caco-2-Zellen setzte sich das Kulturmedium wie folgt zusammen (Tabelle 15):

Tabelle 15: Zusammensetzung der für die Transportversuche verwendeten Zellkulturmedien

	Passage > 26	Passage > 70
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	500 ml	500 ml
L-Glutamin	8,5 ml (1,5%)	9,3 ml (1,5%)
Fötales bovines Serum (FBS)	50 ml (8%)	100 ml (16%)
Nichtessentielle Aminosäuren (NEA)	5,7 ml (1%)	6,2 ml (1%)
Penicillin-Streptomycin (100 U/ml - 100 µg/ml)	5,7 ml (1%)	6,2 ml (1%)

Nach der Aussaat der Zellen wurde das Medium jeden zweiten Tag gewechselt und da nach Erreichen der Konfluenz die Differenzierung der Zellen einsetzt, die Zellen bei etwa 90%-iger Konfluenz (nach 5-7 Tagen) mit Trypsin-EDTA (0,25%; 0,53 mM) 1:5 vereinzelt. Zur weiteren Kultivierung bzw. Aussaat für Transportstudien in Transwells war die Bestimmung der Zelldichte in einer Bürker-Zählkammer erforderlich.

5.1.2.3. Transportstudien

Für In-vitro-Untersuchungen von Transportprozessen durch die gastrointestinale Barriere werden heute hauptsächlich Caco-2-Zellen verwendet, da sie sehr gut das Darmepithel simulieren und vor allem aufgrund des langen und vielfältigen Einsatzes gut charakterisiert sind. Das substratspezifische Massentransport/Zeit-Profil wird als Maßstab zur Abschätzung dafür verwendet, ob eine Substanz hoch, mittel oder gering permeabel ist. Demnach sind Substanzen mit einer Permeabilität $P_{app} < 1 \cdot 10^{-6}$ cm/sec als niedrigpermeabel, mit P_{app} -Werten $< 1 \cdot 10^{-5}$ cm/sec als mittelpermeabel und mit Permeabilitäten $P_{app} > 1 \cdot 10^{-6}$ cm/sec als hochpermeabel zu bezeichnen.

Die Fragestellung hinsichtlich der bevorzugten Richtung von Permeationsprozessen ist eng mit der Existenz von Effluxproteinen (z.B. P-GP) verknüpft. So ist eine Beteiligung von exsorbitiven Carriersystemen wahrscheinlich, wenn der Substanztransport von basolateral nach apikal schneller abläuft als in der Gegenrichtung. Temperaturspezifische Untersuchungen bei 4°C können die Annahme

eines aktiven, energieabhängigen Transports stützen, da bei dieser Temperatur die Aktivität energieabhängiger Carriersysteme vernachlässigt werden kann. Ebenso können Konzentrationsabhängigkeiten von Transportprozessen herangezogen werden, um eine Aussage darüber zu treffen, ob eine Substanz einem aktiven oder passiven Transport unterliegt.

Zur Durchführung der Transportexperimente wurden die Caco-2-Zellen beider Passagen in einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen je 12 mm (bei radioaktiv gelabelten Modellsubstanzen) oder $3 \cdot 10^5$ Zellen je 24 mm Transwell (bei Losartan und EXP 3174) ausgesät. Die Zellen blieben über einen Zeitraum von 2, 3 und 4 Wochen in Kultur, wobei jeden zweiten Tag das Medium (Zusammensetzung unter 5.1.2.2. beschrieben) erneuert wurde.

Alle Transportstudien wurden bei 37°C und jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Transportmedium diente Hank's Salzlösung (HBSS) gepuffert mit 10 mM MES und eingestellt auf pH 6,5. Die Kontrolle der Integrität der Zellmonolayer erfolgte über die Messung des Transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) der Monolayer mit Hilfe von EVOM „Chopstick“-Elektroden, sowie zusätzlich durch Quantifizierung des parazellulären Fluxes von ^{14}C -Mannitol.

Abhängig von den physikochemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanz (Lipophilie, hohe oder geringe Permeabilität) wurden die experimentellen Bedingungen so ausgewählt, dass generell schlecht lösliche Substanzen mit geringer Permeabilität in größeren Transwells, mit größerer Permeationsfläche und größerem Volumen untersucht wurden, um ausreichende Konzentrationen bzw. Mengen im Akzeptor zu erreichen. Die Transportstudien wurden durchgeführt wie in Tabelle 16 beschrieben.

Der Flux von R/S-Atenolol (^3H), R/S-Baclofen (^{14}C), S-Baclofen (^3H), Gly-Pro (^3H), D-Mannitol (^{14}C), R/S-Metoprolol (^3H), L-Phenylalanin (^{14}C), R/S-Propranolol (^3H) und R/S-Talinolol (^3H) wurde unter Zusatz von geringen Mengen radioaktiv gelabelter Substanz zu nichtgelabelter Donorlösung mittels Flüssigszintillationszählung ermittelt. Der Konzentrations-Zeit-Verlauf zur Berechnung der P_{eff} -Werte von Losartan und EXP 3174 während der Transportuntersuchungen wurde durch HPLC-Analytik bestimmt.

Tabelle 16: Übersicht zum Studiendesign der Transportstudien mit Caco-2-Zellmonolayern

		Transportstudiendesign für:			
		Transwells 1,13 cm²	Transwells 4,71 cm²		
Kulturbedingungen					
	Passagen	Caco-2 P77/79	Caco-2 P30/31 und P77/79		
	Zelldichte	100000/well (1,13 cm ²)	300000/well (4,71 cm ²)		
	Kulturdauer	2, 3 und 4 Wochen	2 und 3 Wochen		
		Wechsel des Kulturmediums alle 2-3 Tage und 12-24 h vor Transportexperiment:			
	Oberes Well	0,5 ml	Oberes Well	1,5 ml	
	Unteres Well	1,5 ml	Unteres Well	2,5 ml	
Transportstudie					
	Substanzen	Atenolol, S-Baclofen, Gly-Pro, Mannitol, Metoprolol, L-Phenylalanin, Propranolol, Talinolol			
		Losartan, EXP 3174			
		TEER-Bestimmung im Kulturmedium 37°C			
		Entfernen des Kulturmediums, zweimaliges Waschen mit Transportpuffer pH 6,5; 37°C			
		Oberes Well	0,5 ml	Oberes Well	1,5 ml
		Unteres Well	1,5 ml	Unteres Well	2,5 ml
		Präinkubation über 30 Minuten mit Transportpuffer pH 6,5; 37°C bzw. Präinkubation über 30 Minuten bei Zusatz von 0,5 mM Verapamil als P-GP-Hemmer im Transportpuffer pH 6,5; 37°C			
		TEER-Bestimmung im Transportpuffer pH 6,5; 37°C			
		Zugabe der Testsubstanz gelöst in Transportpuffer pH 6,5; 37°C bzw. Transportpuffer mit Zusatz von 0,5 mM Verapamil pH 6,5; 37°C:			
		a-b Transport	Donor 0,6 ml Akzeptor 1,5 ml	a-b Transport	Donor 1,6 ml Akzeptor 2,5 ml
		b-a Transport	Donor 1,6 ml Akzeptor 0,5 ml	b-a Transport	Donor 2,6 ml Akzeptor 1,5 ml
		Probenentnahme in <u>Donor und Akzeptor</u> : t=0 und t=120 min			
		Probenentnahme im <u>Akzeptor</u> :			
		t = 30, 60, 90, 120 min	t = 10, 20, 30, 60, 90, 120 min		
		Donor	100 µl	Donor	100 µl
	Akzeptor	500 µl	Akzeptor	600 µl	
	Ersatz der im <u>Akzeptor</u> entnommenen Menge durch HBSS pH 6,5; 37°C:				
	a-b Transport	1500 µl	a-b Transport	600 µl	
	b-a Transport	100 µl	b-a Transport	600 µl	
	Entfernen der Transportlösung und Ersetzen mit HBSS pH 6,5; 37°C				
	Inkubation 30 min, 37°C				
	Versuchsende: TEER-Bestimmung im Transportpuffer pH 6,5; 37°C und RT				

5.1.2.4. Permeabilitätsberechnung

Die effektiven Permeabilitätskoeffizienten P_{eff} [cm/sec] wurden aus den Konzentrations-Zeit-Profilen der Testsubstanz im Akzeptor mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$P_{\text{eff}} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{V}{A \cdot C_0}$$

dQ/dt	transepithelialer Flux durch die Zellmonolayer [ng/ml bzw. dpm/ml/min]
V	Volumen des Akzeptors [cm ³]
A	Fläche der Zellmonolayer [cm ²]
C_0	Initiale Konzentration der zu bestimmenden Substanz im Donor [mg/ml]

Die Berechnung des transepithelialen Fluxes durch die Zellmonolayer erfolgte aus dem Anstieg der linearen Regressionsgeraden über den Untersuchungszeitraum (transportierte Substanzmenge vs. Zeit).

5.2. In-situ-Rattendarmperfusionen

5.2.1. Chemikalien und Geräte

5.2.1.1. Chemikalien

Benzoessäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Calcein	2',7'-Bis[[bis(carboxymethyl)amino]methyl]fluorescein Sigma, St. Louis, USA
Calciumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Coffein	1,3,7-Trimethyl-2,6(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-purindion Sigma, St. Louis, USA
Diethylether	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EXP 3174	2-Butyl-4-chlor-1-{4-[2-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl}imidazol-5-carbonsäure Du Pont Merck, Merck Pharmaceuticals, Wilmington, Delaware, USA
Glucose	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Indometacin	1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolessigsäure Germed Berlin-Chemie, Berlin, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketamin	(RS)-2-(2-Chlorphenyl)-2-(methylamino)cyclohexanon Ketamin-Ratiopharm 100 O.K., Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Losartan	2-Butyl-4-chlor-1-{4-[2-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl}imidazol-5-methanol Du Pont Merck, Merck Pharmaceuticals, Wilmington, Delaware, USA
Magnesiumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Probenecid	4-(Dipropylsulfamoyl)benzoessäure Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
PSC 833	Cyclo{[(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>E</i>)-4-methyl-2-(methylamino)-3-oxooct-6-enoyl]-valyl-N-methylglycyl-N-methylleucyl-valyl-N-methylleucyl-alanyl-N-methylleucyl-N-methylleucyl-N-methylvalyl} Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz

Rifampicin	(12Z,14E,24E-2S,16S,17S,18R,19R,20R,21S,22R,23S)-5,6,9,17,19-Pentahydroxy-23-methoxy-2,4,12,16,18,20,22-heptamethyl-8-(4-methylpiperazin-1-yliminomethyl)-1,11-dioxo-1,2-dihydro-2,7-(epoxypentadeca[1.11.13]trienimino)naphtho[2,1-b]furan-21-ylacetat Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Rompun	2-(2,6-Xylidino)-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazin Rompun™ Injektionslösung 2 %, BayerVital, Leverkusen, Deutschland
Talinolol	(RS)-1-{4-[3-(<i>tert</i> -Butylamino)-2-hydroxypropoxy]phenyl}-3-cyclohexylurea Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul, Deutschland
Taurin	2-Aminoethansulfonsäure Sigma, St. Louis, USA
Tyrode-Puffer	Zusammensetzung: NaCl 8g/l, KCl 0,2 g/l, CaCl ₂ 0,2 g/l, MgCl ₂ 0,1 g/l, NaH ₂ PO ₄ 0,04 g/l, NaHCO ₃ 1 g/l, Glucose 1 g/l, pH 7,0
Verapamil	(RS)-2-Isopropyl-2,8-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-6-azaocantinitril Verapamil-Hydrochlorid, Sigma, St. Louis, USA
Vinblastin	[3aR-[3a α ,4 β ,5 β ,5a β ,9(3R*,5S*,7R*,9S*),10bR*,13a α]]-Methyl-4-(acetyloxy)-3a-ethyl-9-[5ethyl-1,4,5,6,7,8,9,10-octahydro-5-hydroxy-9-(methoxy-carbonyl)2H-3,7-methanoazacyclo-undecino[5,4-b]indol-9-yl]-3a,4,5,5a,6,11,12,13a-octahydro-5-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-1H-indolizino[8,1-cd]carbazol-5-carboxylat Vinblastinsulfat-GRY 10, GRY-Pharma GmbH, Kirchzarten, Deutschland

5.2.1.2. Geräte

Peristaltische Pumpe	Ismatec MC-MS CA 8/6 Peristaltische Pumpe, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz
pH-Meter	Jonway 3051, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Schläuche	Silikonschlauchverbindungen, Innendurchmesser 2 mm und Außendurchmesser 4 mm, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
Wärmedecke	
Wasserbad	Thermomix 1420 B Typ 850022, Braun-Melsungen AG, Deutschland

5.2.2. Chirurgischer Eingriff und Perfusionsbedingungen

Um Aussagen über die intestinale Permeabilität zu erhalten, wurden die bereits an Caco-2-Zellmonolayern getesteten Substanzen in situ am perfundierten Rattendarm untersucht. Die Perfusionstechnik basiert im Wesentlichen auf einer von Hanafy (2001) etablierten Methode, die den Vorteil besitzt, dass die serosale Seite des Darmsegmentes über den gesamten Versuchszeitraum im Sinne einer Single-pass-Perfusion perfundiert wird und so der Aufbau eines Konzentrationsgradienten von der Mukosa- zur Serosaseite verhindert wird.

Mit Hilfe dieser Technik wurden bestimmte Darmsegmente mit der jeweiligen Perfusionslösung bei konstanter Perfusionsrate perfundiert. Nach einer festgelegten Vorlaufzeit, die zur Einstellung von Steady-state-Bedingungen benötigt wird, sammelt man das Perfusat über einen bestimmten Zeitraum und kann anschließend daraus die Nettofluxe der Arzneistoffe per HPLC-Analytik ermitteln.

Die tierexperimentellen Arbeiten zur Durchführung der In-situ-Perfusionsstudien wurden durch das zuständige Regierungspräsidium des Landes Sachsen-Anhalt genehmigt und waren so konzipiert, dass

mit einer geringen Tierzahl ein maximaler Informationsgehalt erhalten werden konnte. Die In-situ-Perfusionsstudien, wurden mit männlichen White-Wistar-Ratten durchgeführt (Charles River Deutschland, Sulzfeld), deren Gewicht 266-418 g betrug ($n=3$ je Behandlung). Einen Tag vor dem operativen Eingriff wurde den Tieren das Futter entzogen, während dieser Zeit hatten sie weiterhin uneingeschränkter Zugang zu Wasser. Der chirurgische Eingriff wurde wie bei Hanafy (2001) beschrieben durchgeführt, wobei die Ratte während der gesamten Versuchsdauer zur Konstanzhaltung der Körpertemperatur auf einer Wärmedecke lag, die auf Körpertemperatur (37°C) aufgeheizt war. Nach leichter Etherbetäubung mit anschließender Intraperitonealanästhesie von 40 mg/kg KG Ketamin und 2 mg Rompun wurde die Bauchhöhle der Ratte durch einen 4-5 cm langen Schnitt in der Linea alba eröffnet und die zu perfundierenden Darmabschnitte (Ileum 3-7 cm und Jejunum 5-8 cm) freigelegt. Das betreffende Segment wurde durch kleine Einschnitte eröffnet und anschließend gründlich durch Spülen mit temperiertem Tyrode-Puffer (pH 7,0; 37°C) gereinigt. Die Schlauchverbindungen (Außendurchmesser 4 mm, Innendurchmesser 2 mm) wurden jeweils am proximalen und distalen Ende des vorbereiteten Segments in der Weise implantiert, dass sie ca. 0,5 cm weit in das Segment eingeführt und mit Nähseide fixiert wurden. Mit temperiertem Tyrode-Puffer (pH 7,0; 37°C) wurden die zu perfundierenden Darmabschnitte von außen befeuchtet, um so die physiologischen Bedingungen weitgehend aufrecht zu erhalten.

Als Transportmedium diente Tyrode-Puffer (pH 7,0; 37°C), der mit einer konstanten Flußrate von 0,2 ml/min durch die Darmabschnitte von cranial nach caudal gefördert wurde. In definierten Intervallen (5 Minuten) wurde das den Darmabschnitt verlassende Perfusat gesammelt und das Volumen durch Ermittlung des Gewichtes bestimmt (Abbildung 25).

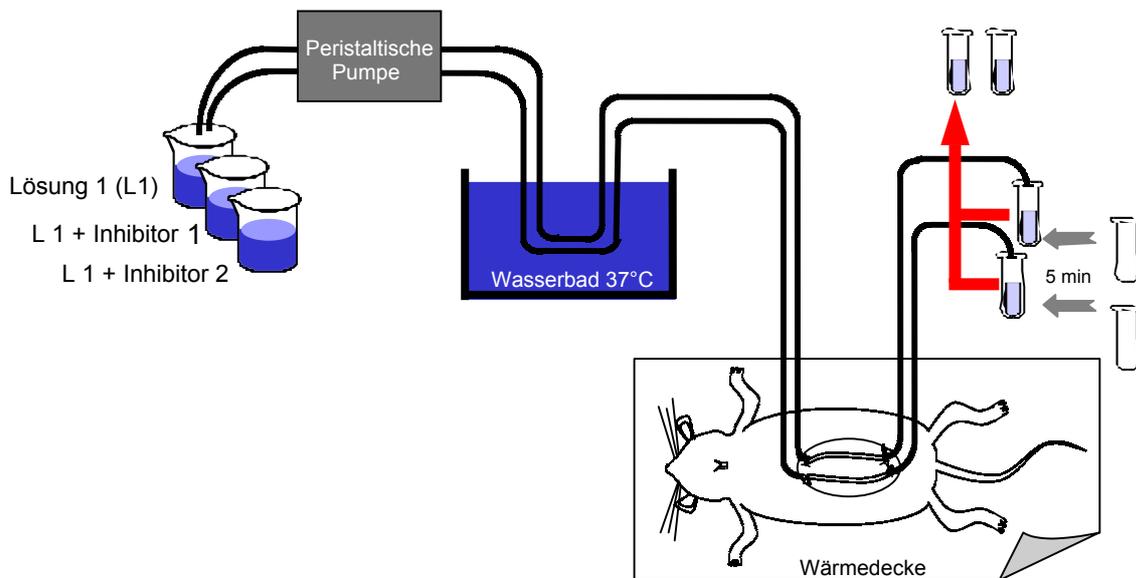


Abbildung 25: Schematische Darstellung der In-situ-Rattendarmperfusion

5.2.3. Design der Perfusionen

5.2.3.1. 1-Stufen-Perfusion – Ermittlung der effektiven Permeabilitäten

Zur Ermittlung der intestinalen Permeabilität von Losartan und EXP 3174 ($n=3$ Ratten) wurde die Perfusion über einen Gesamtzeitraum von 105 Minuten durchgeführt. Um Steady-state-Bedingungen zu gewährleisten, wurden nach einem Vorlauf von 15 Minuten (keine Einbeziehung in P_{eff} -Wertberechnung) Ileum und Jejunum 90 Minuten mit Losartan- bzw. EXP 3174-Lösung (0,01 mM in Tyrode-Puffer pH 7,0) perfundiert. Die Ermittlung der P_{eff} -Werte erfolgte nur unter Steady-state-Bedingungen.

5.2.3.2. 2-Stufen-Perfusion – Beeinflussung der P_{eff} -Werte durch potentielle Inhibitoren für Transporter

Um den Einfluss von Inhibitoren verschiedener Transportsysteme auf die intestinale Permeabilität von Losartan und EXP 3174 zu testen, wurden 2-Stufen-Perfusionen (n=3 Tiere) über einen Gesamtzeitraum von 90 Minuten nach folgendem Schema durchgeführt:

- Periode 1: 30 Minuten Steady-state-Perfusionsperiode mit Losartan oder EXP 3174 bzw. Losartan/EXP 3174
- Periode 2: 30 Minuten Steady-state-Perfusionsperiode mit Losartan/EXP 3174 plus Inhibitor intestinaler Transportprozesse.

Die Einstellung von Steady-state-Bedingungen erfolgte jeweils durch einen 15 minütigen Vorlauf, sowohl zu Perfusionsbeginn (0,01 mM Losartan/EXP 3174 allein) als auch nach Zugabe des Inhibitors zum Perfusat (0,01 mM Losartan/EXP 3174 plus Inhibitor). Als Inhibitoren kamen folgende Substanzen zum Einsatz, die jeweils in Tyrode-Puffer (pH 7,0; 37°C) gelöst waren:

EXP 3174 und Losartan (jeweils 0,01 mM), Vinblastin (0,1 mM), Verapamil (0,5 mM), Coffein (0,6 mM), Benzoesäure sowie Calcein, Indometacin, Probenecid (jeweils 1 mM) und Taurin (32 mM).

Zur Ermittlung der P_{eff} -Werte wurden wiederum nur die unter Steady-state-Bedingungen gewonnenen Daten herangezogen.

5.2.3.3. 3-Stufen-Perfusion – Vergleich der P_{eff} -Werte für Losartan und Talinolol bei Perfusion zu unterschiedlichen Tageszeiten: Testung von Transporthemmern und Bestimmung der hemmbaren Fraktion am Tag und in der Nacht

Zur Untersuchung von tageszeitlichen Einflüssen auf die intestinalen Transportsysteme wurden 3-Stufen-Perfusionen (n=3 Tiere) mit 12 Stunden Zeitdifferenz (Tag: 11 bis 13³⁰ Uhr und Nacht: 23 bis 1³⁰ Uhr) zwischen den Einzelerperimenten sowohl mit Losartan als auch mit Talinolol über einen Gesamtzeitraum von 165 Minuten nach folgendem Schema durchgeführt:

- Periode 1: 40 Minuten Steady-state-Perfusionsperiode mit Losartan bzw. Talinolol
- Periode 2: 40 Minuten Steady-state-Perfusionsperiode mit Losartan bzw. Talinolol plus Inhibitor intestinaler Transportprozesse
- Periode 3: 40 Minuten Steady-state-Perfusionsperiode mit Losartan bzw. Talinolol plus P-GP-Inhibitor Vinblastin

Die Einstellung von Steady-state-Bedingungen erfolgte jeweils durch einen 15 minütigen Vorlauf, sowohl zu Perfusionsbeginn (0,01 mM Losartan/Talinolol allein) als auch nach Zugabe des Inhibitors zum Perfusat (0,01 mM Losartan/Talinolol plus Inhibitor). Als Inhibitoren kamen folgende Substanzen zum Einsatz (jeweils in Tyrode-Puffer pH 7,0 gelöst):

EXP 3174 und Losartan (0,01 mM), Vinblastin (0,1 mM), Verapamil (0,5 mM), Rifampicin (50 µM) bzw. PSC 833 (20 µM).

Zur Ermittlung der P_{eff} -Werte wurden ebenfalls nur die Steady-state-Bedingungen herangezogen.

5.2.4. Berechnungen

5.2.4.1. Wassertransport

Die Ermittlung des Wassertransportes [%] erfolgte über Gewichtsbestimmung und wurde während der gesamten Perfusionsdauer für jede Sammelperiode nach folgender Gleichung durchgeführt:

$$\text{Wassertransport} = 100 \cdot \frac{(W_{in} - W_{out})}{W_{in}}$$

W_{in} Gewicht [g] der Lösung bei Eintritt in Darmsegment
 W_{out} Gewicht [g] der Lösung bei Austritt vom Darmsegment

Der Wert für den Wassertransport der Sammelperiode ging als Korrekturfaktor (basierend auf dem Verhältnis W_{out}/W_{in}) in die Berechnung der effektiven Permeabilitäten mit ein.

5.2.4.2. Intestinale Permeabilität

Die intestinalen Permeabilitäten P_{eff} [cm/sec] wurden wie von Sinko (1991) beschrieben berechnet. Die Berechnung erfolgte nach folgender Gleichung unter der Annahme des Mixed-tank-Modells:

$$P_{eff} = Q \cdot \frac{\frac{C_{in}}{C_{out}} - 1}{2\pi r l}$$

Q Flußrate [ml/min]
 C_{in} Konzentration [ng/ml] bei Eintritt ins Darmsegment
 C_{out} Konzentration [ng/ml] bei Austritt vom Darmsegment
 r Radius [cm] des Darmsegmentes
 l Länge [cm] des Darmsegmentes

Für jede Perfusionsperiode und Ratte wurden die effektiven Permeabilitäten berechnet. Die Mittelwerte für unterschiedliche Tiere wurden anhand dieser P_{eff} -Werte ermittelt. Den Berechnungen wurde für Ileum und Jejunum ein Darmsegmentradius von 0,21 cm zugrunde gelegt (Yuasa 1988).

5.3. In-vivo-Untersuchungen

5.3.1. Chemikalien und Geräte

5.3.1.1. Chemikalien

EXP 3174	2-Butyl-4-chlor-1-{4-[2-(1H-tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl}imidazol-5-carbonsäure Du Pont Merck, Merck Pharmaceuticals, Wilmington, Delaware, USA
Losartan	2-Butyl-4-chlor-1-{4-[2-(1H-tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl}imidazol-5-methanol Du Pont Merck, Merck Pharmaceuticals, Wilmington, Delaware, USA
Methylcellulose	Methylcellulose 4000 pure, Serva Feinbiochemica, Heidelberg, New York, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	β -D-Fructofuranosyl- α -D-glucopyranosid Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Verapamil	(RS)-2-Isopropyl-2,8-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-6-azaoctannitril

Verapamil-Hydrochlorid, Sigma, St. Louis, USA

Verapamil-Hydrochlorid, Verapamil-Ratiopharm 5, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

5.3.1.2. Geräte

Homogenisator	Janke & Kunkel Ultra-Turrax TP 18/10 Nr. 15918, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
pH-Meter	Jonway 3051, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
Waage	Sartorius Basic, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

5.3.2. Kinetikuntersuchungen

5.3.2.1. Studiendesign

Die In-vivo-Studien wurden von Prof. Dr. Peter Langguth (Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Biopharmazie und Technologie) bei AstraZeneca in der Abteilung Präklinische Pharmakokinetik (AstraZeneca, Mölndal Schweden) durchgeführt.

Die pharmakokinetischen Untersuchungen erfolgten mit männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Møllegaard, Dänemark), die zum Zeitpunkt der Applikation ein durchschnittliches Körpergewicht von 304 g besaßen. Die Arteria carotis und die Vena jugularis der Versuchstiere wurde nach der „Popovic“-Methode (Popovic 1956) permanent kanüliert. Zur kontinuierlichen Sammlung der Gallenflüssigkeit und zur Ermittlung der kumulativen biliären Ausscheidung von Losartan und EXP 3174 wurde einem Teil der Tiere (n=3 je Zeitpunkt) der Gallengang katheterisiert (Katheterlänge 90 cm \cong 0,18 ml Katheterinnenvolumen). Nach Isofluorangas-Anästhesie wurde die Operation durchgeführt, die Tiere für einen Tag im Käfig gehalten und am übernächsten Tag die Applikation durchgeführt. Am Abend vor der Applikation wurde den Tieren das Futter entzogen, wobei sie aber weiterhin uneingeschränkt Zugang zu Wasser hatten. Nach einmaliger Applikation von Losartan bzw. EXP 3174 am Tag darauf in die Vena jugularis bzw. peroral mittels Schlundsonde wurden in festgelegten Zeitabständen aus der Arteria carotis Blutproben entnommen. Nach Abschluss der Experimente wurden die Tiere mit CO₂ getötet.

5.3.2.1.1. Intravenöse Applikation

Sechs Ratten (davon 3 Tiere mit Gallengangsdrainage), die ein durchschnittliches Körpergewicht von 303 \pm 5 g hatten, erhielten parenteral (i.v.) eine einmalige Dosis Losartan bzw. EXP 3174 (3 mg/kg KG). Die verabreichte Substanz war in 0,9%-iger Kochsalzlösung gelöst und das Applikationsvolumen betrug 2 ml/kg KG. Nach 0, 5, 20, 60, 180, 360, 480, 720 und 1440 Minuten wurden den Ratten zur Erstellung von individuellen Konzentrations-Zeit-Profilen Blutproben entnommen.

Zur Gewinnung der Galleproben wurden 3 Ratten eingesetzt. Für die Untersuchungen nach Losartanapplikation wurde die produzierte Galle in den ersten 3 Stunden in 30-min-Intervallen und in 60-min-Intervallen bis 9 Stunden nach Applikation gesammelt. In dem Zeitraum 9-26 Stunden nach Applikation der i.v.-Dosis betragen die Sammelintervalle 15 h (9-24 h) und 2 h (24-26 h). Nach Applikation von EXP 3174 erfolgte die Sammlung der produzierten Galle in den ersten 3 Stunden in 30 minütigen Intervallen und in 60 minütigen Intervallen bis 8 Stunden nach Applikation. In dem Zeitraum 8-26 Stunden nach Applikation der i.v.-Dosis betragen die Sammelintervalle 16 h (8-24 h) und 2 h (24-26 h). Innerhalb des Sammelintervalls wurden die Katheter nicht entleert.

5.3.2.1.2. Perorale Applikation

Sechs Ratten (davon 3 Tiere mit Gallengangsdrainage) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 295 ± 2 g erhielten über eine Pharyngealsonde Losartan bzw. EXP 3174 als Einmaldosis (10 mg/kg KG). Die verabreichte Substanz war in 0,9%-iger Kochsalzlösung gelöst und das Applikationsvolumen betrug 5 ml/kg KG. Nach 0, 5, 20, 60, 180, 360, 480, 720 und 1440 Minuten wurden den Ratten Blutproben entnommen.

Zur Gewinnung der Galleproben wurden 3 Ratten genutzt. Für die Untersuchungen nach Losartanapplikation wurde die produzierte Galle in den ersten 3 Stunden in 30-min-Intervallen und in 60-min-Intervallen bis 12 Stunden nach Applikation gesammelt. In dem Zeitraum 12-26 Stunden nach Applikation der p.o.-Dosis betragen die Sammelintervalle 11,5 h (12-23,5 h), 30 min (23,5-24h) und 2 h (24-26 h). Nach Applikation von EXP 3174 erfolgte die Sammlung der produzierten Galle in den ersten 3 Stunden ebenfalls in 30-min-Intervallen und in 60-min-Intervallen bis 8 Stunden nach Applikation. In dem Zeitraum 8-26 Stunden nach Applikation der p.o.-Dosis betragen die Sammelintervalle 16 h (8-24 h) und 2 h (24-26 h). Innerhalb des Sammelintervalls wurden die Katheter nicht entleert.

5.3.2.2. Pharmakokinetische Auswertung

Zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter der In-vivo-Rattenstudie, die mit Hilfe des Datenanalysensystems TopFit, Version 2.0, erfolgte, wurden vorwiegend nicht-kompartimentelle Verfahren herangezogen, bei denen die Parameter direkt aus den durch die Datenpunkte beschriebenen Konzentrations-Zeit-Kurven ermittelt wurden.

Der zeitliche Verlauf der Arzneistoffkonzentration im Organismus kann mit Hilfe der Annahme beschrieben werden, dass der Körper ein System von kinetischen Kompartimenten darstellt. Dabei müssen diese Kompartimente nicht unbedingt eine physiologische Grundlage besitzen. Von einer linearen Kinetik spricht man, wenn der Transport des zu untersuchenden Pharmakons in die einzelnen Kompartimente nach einer Kinetik erster Ordnung erfolgt bzw. keine Dosisabhängigkeit zu entnehmen ist. Des weiteren besteht die Möglichkeit die Konzentrations-Zeit-Verläufe eines Arzneistoffes im Organismus mit Hilfe von statistischen Momenten zu beschreiben. Dabei wird die Verweildauer des Arzneistoffes und der zeitliche Konzentrationsverlauf als eine statistische Häufigkeitsverteilung angesehen, die unabhängig von den Kompartimenten ist.

Bezeichnung	Abkürzung	Ermittlung / Berechnung
Maximale Plasmakonzentration	C_{\max}	Direkte Bestimmung aus den Plasmakonzentrations-Zeit-Profilen
Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration	t_{\max}	Direkte Bestimmung aus den Plasmakonzentrations-Zeit-Profilen
Terminale Geschwindigkeitskonstante	λ	Ermittlung erfolgte mittels log-linearer Regression anhand der letzten fünf Datenpunkte der Blutspiegelkurve
Terminale Halbwertszeit Zeit, in der der Blutspiegel des Pharmakons auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes abfällt.	$t_{1/2}$	Die Ermittlung der terminalen Halbwertszeit erfolgte nach der Formel: $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$
Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve bis zum letzten Datenpunkt - Area under the data	AUD	Ansteigender Teil der Kurve : lineare Trapezregel Absteigender Teil der Kurve : logarithmische Trapezregel

Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve bis Unendlich - Area under the curve	AUC _{0-∞}	Summe aus AUD und AUC _{t_{last}-∞} . Zusätzlich Extrapolation nach Unendlich auf Basis des letzten Datenpunktes C _{last} nach der Formel:
		$AUC_{t_{last} - \infty} = \frac{C_{last}}{\lambda}$
Fläche unter der ersten Momentkurve - Area under the first moment curve	AUMC	Fläche unter der Kurve aus dem Produkt der Plasmakonzentration mit der Zeit. Berechnung erfolgt wie AUD.
Mittlere Verweilzeit - Mean Residence Time Im Rahmen der statistischen Momentanalyse durchschnittliche Verweilzeit eines intakten Wirkstoffmoleküls im Organismus.	MRT	$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$
Absolute Bioverfügbarkeit Fraktion der Dosis des Pharmakons, die in den systemischen Kreislauf gelangt.	F	$F = \frac{AUC_{p.o.} \cdot D_{i.v.}}{AUC_{i.v.} \cdot D_{p.o.}} \cdot 100\%$
Biliär ausgeschiedene Menge	Ae _{0-∞}	Die kumulativ in der Galle ausgeschiedene Substanzmenge ergibt sich durch Addition der Mengen in den einzelnen Sammelintervallen. Bei der Bestimmung der Ae _{0-∞} wurde ausgehend vom letzten Messpunkt gegen Unendlich extrapoliert:
		$Ae_{0-\infty} = \frac{Ae_{0-t}}{1 - e^{-\lambda t}}$
Verteilungsvolumen - Volume of Distribution Maß für die Verteilung des Arzneistoffes im Körper unter Annahme vollständiger Absorption bzw. Proportionalitätsfaktor, der die gemessene Arzneistoffmenge C mit der Gesamtarzneistoffmenge X im Organismus verbindet.	V _D	Berechnung mit Hilfe der statistischen Momente nach oraler Gabe nach der Formel : $V_D = \frac{X}{C} = \frac{F \cdot D \cdot AUMC}{AUC^2}$ D = Dosis (100% bzw. 1 bei i.v.-Gabe)
Clearance Diese Größe beschreibt das virtuelle Blut- bzw. Plasmavolumen in ml, das pro Zeiteinheit von der betreffenden Substanz befreit wird.	CL	Nach oraler Applikation Berechnung nach der Formel $CL = \frac{F \cdot D}{AUC} \quad CL/F = \frac{D}{AUC}$

Für die Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven nach intravenöser Applikation sind aufgrund der zunächst erfolgenden Verteilung im Körper vom Applikationsort ausgehend sehr oft keine gemessenen Werte für den Applikationszeitpunkt verfügbar. Aus diesem Grund ist es erforderlich, dass für diesen Zeitpunkt ein Wert bestimmt wird, der dann in die Berechnung der AUC einfließt. Für die Extrapolation der Trapezfläche unter der Datenkurve vom ersten gemessenen Zeitpunkt an bis zum Applikationszeitpunkt muss eine initiale Konzentration C₀ abgeschätzt werden, wobei im Falle der Kinetik als auch der Verteilungsstudien die folgende Methode für die Auswertung der i.v.-Bolusdaten zum Einsatz kam:

$$C_0 = \frac{C_1 - C_2}{t_1 - t_2} \cdot (t_1 - t_0) + C_1$$

Das Verteilungsvolumen während eines Pseudo-Verteilungsgleichgewichtes (V_D) ist ein Proportionalitätsfaktor, der die Konversion der Konzentrationen erlaubt, die während der terminalen log-

linearen Phase der Arzneistoffelimination im Vergleich zur Substanzmenge im Körper beobachtet wurden (Menge = $V_D \cdot C(t)$). Es kann nach folgender Formel ermittelt werden:

$$V_D = \frac{CL}{\lambda}$$

Für die Ermittlung der $t_{1/2}$ der Galle Daten wurde die Ausscheidungsgeschwindigkeit in der Galle (dB/dt) gegen die Mittelpunktzeit t_{mid} des Sammelintervalles aufgetragen. Aus diesem Plot wurde $t_{1/2}$ nach der oben angegebenen Formel anhand der letzten 9-10 Datenpunkte berechnet.

5.3.3. Verteilungsstudien

5.3.3.1. Studiendesign

Die tierexperimentellen Arbeiten zur Durchführung der In-vivo-Verteilungsstudien wurden durch das zuständige Regierungspräsidium des Landes Sachsen-Anhalt genehmigt und waren so konzipiert, dass mit einer geringen Tierzahl ein maximaler Informationsgehalt erhalten werden konnte. Für die Verteilungsstudien wurden männliche White-Wistar-Ratten (Charles River Deutschland, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 218 ± 2 g verwendet. Den Versuchstieren wurde 18 Stunden vor Applikation das Futter entzogen, wobei sie aber weiterhin uneingeschränkt Zugang zu Wasser hatten.

Für jede Applikationsart (parenteral und peroral) wurden 2 Kollektive mit jeweils 3 Ratten pro Zeitpunkt gebildet, wobei eine Gruppe Losartan bzw. EXP 3174 allein und die andere in Kombination mit Verapamil (20 mg/kg KG) erhielt. Die Untersuchungen wurden in randomisierter Form durchgeführt (Tabelle 17), wobei an jedem Versuchstag eine Gruppe von 4 Tieren pro Kollektiv zum Einsatz kam und keine Beeinflussung durch tageszeitliche Schwankungen stattfand. Die Substanzen (Losartan, EXP 3174 und Verapamil) wurden für die parenterale Applikation in 0,9%-iger Kochsalzlösung und für die perorale Applikation in 0,5% Methylcellulose suspendiert und wurden den Tieren als einmalige Dosis parenteral (i.v., Schwanzvene, 3 mg/kg KG) bzw. über eine Pharyngealsonde (p.o., 10 mg/kg KG) appliziert.

Nach 1, 2, 4 und 6 Stunden nach parenteraler bzw. 2, 4, 6 und 8 Stunden nach peroraler Applikation wurden die Tiere durch Genickschlag getötet, um Blut und Gewebe (Leber, Niere, Herz, Darmsegmente (Ileum, Jejunum)) zu entnehmen. Die Blutproben wurden mit EDTA stabilisiert und bis zur HPLC-Analytik bei -20°C eingefroren. Die Gewebe wurden nach Entnahme gewogen, mit physiologischer Kochsalzlösung zur Entfernung eventuell noch vorhandenen Blutes gespült, mit 0,25 M Saccharoselösung (1:1; m/m) homogenisiert und bis zur HPLC-Analytik bei -20°C eingefroren.

Tabelle 17: Design der Applikation der Verteilungsstudie mit Losartan und EXP 3174 mit und ohne Coadministration von Verapamil

Zeitpunkte [Stunden]		Intravenöse Applikation				Perorale Applikation			
		1	2	4	6	2	4	6	8
Losartanstudie									
Tag 1	Losartan	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 25	Tier 26	Tier 27	Tier 28
	Losartan + VERA	Tier 5	Tier 6	Tier 7	Tier 8	Tier 29	Tier 30	Tier 31	Tier 32
Tag 2	Losartan	Tier 9	Tier 10	Tier 11	Tier 12	Tier 33	Tier 34	Tier 35	Tier 36
	Losartan + VERA	Tier 13	Tier 14	Tier 15	Tier 16	Tier 37	Tier 38	Tier 39	Tier 40
Tag 3	Losartan	Tier 17	Tier 18	Tier 19	Tier 20	Tier 41	Tier 42	Tier 43	Tier 44
	Losartan + VERA	Tier 21	Tier 22	Tier 23	Tier 24	Tier 45	Tier 46	Tier 47	Tier 48
EXP 3174-Studie									
Tag 1	EXP 3174	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 25	Tier 26	Tier 27	Tier 28
	EXP 3174 + VERA	Tier 5	Tier 6	Tier 7	Tier 8	Tier 29	Tier 30	Tier 31	Tier 32
Tag 2	EXP 3174	Tier 9	Tier 10	Tier 11	Tier 12	Tier 33	Tier 34	Tier 35	Tier 36
	EXP 3174 + VERA	Tier 13	Tier 14	Tier 15	Tier 16	Tier 37	Tier 38	Tier 39	Tier 40
Tag 3	EXP 3174	Tier 17	Tier 18	Tier 19	Tier 20	Tier 41	Tier 42	Tier 43	Tier 44
	EXP 3174 + VERA	Tier 21	Tier 22	Tier 23	Tier 24	Tier 45	Tier 46	Tier 47	Tier 48

5.3.3.2. Datenanalyse

Die Auswertung der Konzentrations-Zeit-Profile im Blut bzw. Organgewebe für jeden Versuchstag wurde mit Hilfe des Datenanalysensystems TopFit, Version 2.0 durchgeführt, wobei die Berechnung der AUD und AUC [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{g}$] auf der Basis der linearen Trapezregel durch nicht-kompartimentelle Verfahren (siehe Kapitel 5.3.2.2.) erfolgte. Zur Abschätzung der terminalen Eliminationshalbwertszeit wurden alle Datenpunkte der Konzentrations-Zeit-Profile herangezogen.

5.4. HPLC-Analytik

Eine analytische Standardmethode zur HPLC-Bestimmung von Losartan und EXP 3174 war von dem Hersteller entwickelt worden (Furtek 1992). Diese Methode basiert auf einer Flüssig-Flüssig-Extraktion von angesäuertem Plasma bzw. Urin mit Methyl-tert.-butylether (MTBE) und teilweiser Rückextraktion in schwach alkalische Lösung. Die reacidifizierte wässrige Teilfraktion wurde anschließend mit n-Hexan gewaschen. Die Trennung der beiden Schichten erfolgte durch Ausfrieren der wässrigen Schicht. Nach Zusatz von Isopropanol zur wässrigen Phase wurde ein Teil dieser Lösung zur HPLC-Analyse mit UV-Detektion bei 254 nm benutzt. Durch das Fehlen einer Probenaufkonzentrierung vor der HPLC-Analyse ist die Reproduzierbarkeit an der beschriebenen Nachweisgrenze von 5 ng/ml in Plasma für beide Analyten und 20 ng/ml in Urin für Losartan bzw. 10 ng/ml in Urin für EXP 3174 nur bedingt möglich gewesen.

Eine spezifischere Methode zur Bestimmung von Losartan und EXP 3174 in biologischem Material wurde von Soldner (1996 (1)) und Fuchs (1999, 2000) entwickelt. Durch die Modifikation der mobilen Phase der ursprünglichen Standardmethode erreichte man eine schärfere Trennung der Analyten. Der prozentuale Anteil von Acetonitril (ACN) wurde von 23% auf 26% erhöht, der Anteil des Phosphatpuffers dagegen von 77% auf 70% gesenkt. Ebenso wurde die Puffermolarität von 0,02 M auf 0,005 M geändert. In einigen Fällen ist eine prozentuale Substitution des ACN durch Methanol (MeOH) und Tetrahydrofuran (THF) erforderlich (Kapitel 5.4.2.). Durch diese Änderung erhält das Fließmittel eine höhere Polarität. Als stationäre Phase verwendeten Furtek und Lo (Furtek 1992) eine Ultremex™ 5 CN Reversed-phase-Säule. Diese Säule konnte ebenso wie die von Soldner (1996 (1)) verwendete Ultremex™ 3 CN Reversed-phase-Säule bei den von uns durchgeführten Versuchen nicht eingesetzt werden, da die Trennung der Analyten von dem von uns ausgewählten internen Standard Benoxapofen nicht vollständig war. Durch Einsatz einer Zorbax CN 5 μm Reversed-phase-Säule konnte dieses Problem behoben werden. Zur Optimierung der Trennung der Analyten vom internen Standard Benoxapofen wurde noch eine Modifikation der mobilen Phase notwendig. Für das von uns verwendete System erhöhte sich der prozentuale Anteil des Natriumdihydrogenphosphatpuffers auf 73%. Ein Teil des ACN-Volumens wurde durch 8% MeOH und 4% THF substituiert, so dass nur noch 17,5% ACN in der mobilen Phase enthalten waren.

5.4.1. Chemikalien und Geräte

5.4.1.1. Chemikalien

Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Benoxapofen	(RS)-2-[2-(4-Chlorphenyl)-5-benzoxazolyl]propionsäure Lilly Research, Windtesham, England
Dichlormethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EXP 3174	2-Butyl-4-chlor-1-[4-[2-(1H-tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl]imidazol-5-carbonsäure Du Pont Merck, Merck Pharmaceuticals, Wilmington, Delaware, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Losartan	2-Butyl-4-chlor-1-{4-[2-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl}imidazol-5-methanol Du Pont Merck, Merck Pharmaceuticals, Wilmington, Delaware, USA
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methyl-tert.-butylether	Fisher Scientific International Company, Loughborough, England
Natriumdihydrogenphosphat	VEB Laborchemie Apolda, Apolda, Deutschland
Natriumhydroxid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Phosphorsäure	VEB Laborchemie Apolda, Apolda, Deutschland
Pindolol	(<i>RS</i>)-1-(4-Indolyl)-3-isopropylamino-2-propanol Sandoz AG, Basel, Schweiz
Salzsäure	VEB Laborchemie Apolda, Apolda, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland
Talinolol	(<i>RS</i>)-1-{4-[3-(<i>tert</i> -Butylamino)-2-hydroxypropoxy]phenyl}-3-cyclohexylurea Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul, Deutschland
Tetrahydrofuran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triethylamin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

5.4.1.2. Geräte

Datenauswertung	Windows 98, Microsoft Excel 97, Microsoft Corporation, USA
HPLC-Degaser	Jasco 3-Line-Degaser DG-980-50, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland
HPLC-Detektor	<u>Losartan und EXP 3174:</u> Jasco Fluoreszenzdetektor FP-920, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland <u>Talinolol:</u> Jasco UV-VIS-Detektor UV-975, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland
HPLC-Probengeber	Jasco Autosampler 854-AS, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland
HPLC-Pumpe	Jasco Pumpe PU 980, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland
HPLC-Säulen	<u>Losartan und EXP 3174:</u> Hauptsäule: Zorbax CN, 5 µm, 150 x 4 mm, Bischoff, Leonberg, Deutschland Vorsäule: Phenosphere CN, 5 µm, 60 x 4 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland <u>Talinolol:</u> Hauptsäule: ChiraSpher NT, 5 µm, 250 x 4 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland Vorsäule: LiChroCART 4-4, LiChrospher 100 Diol, 5 µm, 4 x 4 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Software	<u>Losartan und EXP 3174:</u> ChromCard für Windows 1.21, CE Instruments, Mailand, Italien <u>Talinolol:</u> Borwin, JMBS Developments, Le Fontanil, Frankreich
Magnetrührer	Magnetic Stirrex HI 300 N, Hanna Instruments, Vertrieb durch Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter	Jonway 3051, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Probenkonzentrator	Techne SC-3/DB-3, Techne Cambridge Ltd., Coxford Cambridge, England
Schüttler	Thys 2, MLW Labortechnik Ilmenau, Ilmenau, Deutschland

Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
Zentrifuge	Labofuge 400 R, Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland

5.4.2. Bioanalytische Bestimmung von Losartan und EXP 3174

5.4.2.1. Chromatographische Bedingungen

Die HPLC-Methode zur Bestimmung von Losartan und EXP 3174 wurde in Fuchs (1999, 2000) beschrieben und basiert auf einer Flüssig-Flüssig-Extraktion beider Substanzen mit anschließender chromatographischer Trennung auf einer Cyano-Phase, die in Abbildung 26 schematisch dargestellt ist.

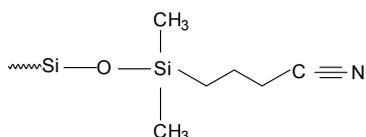
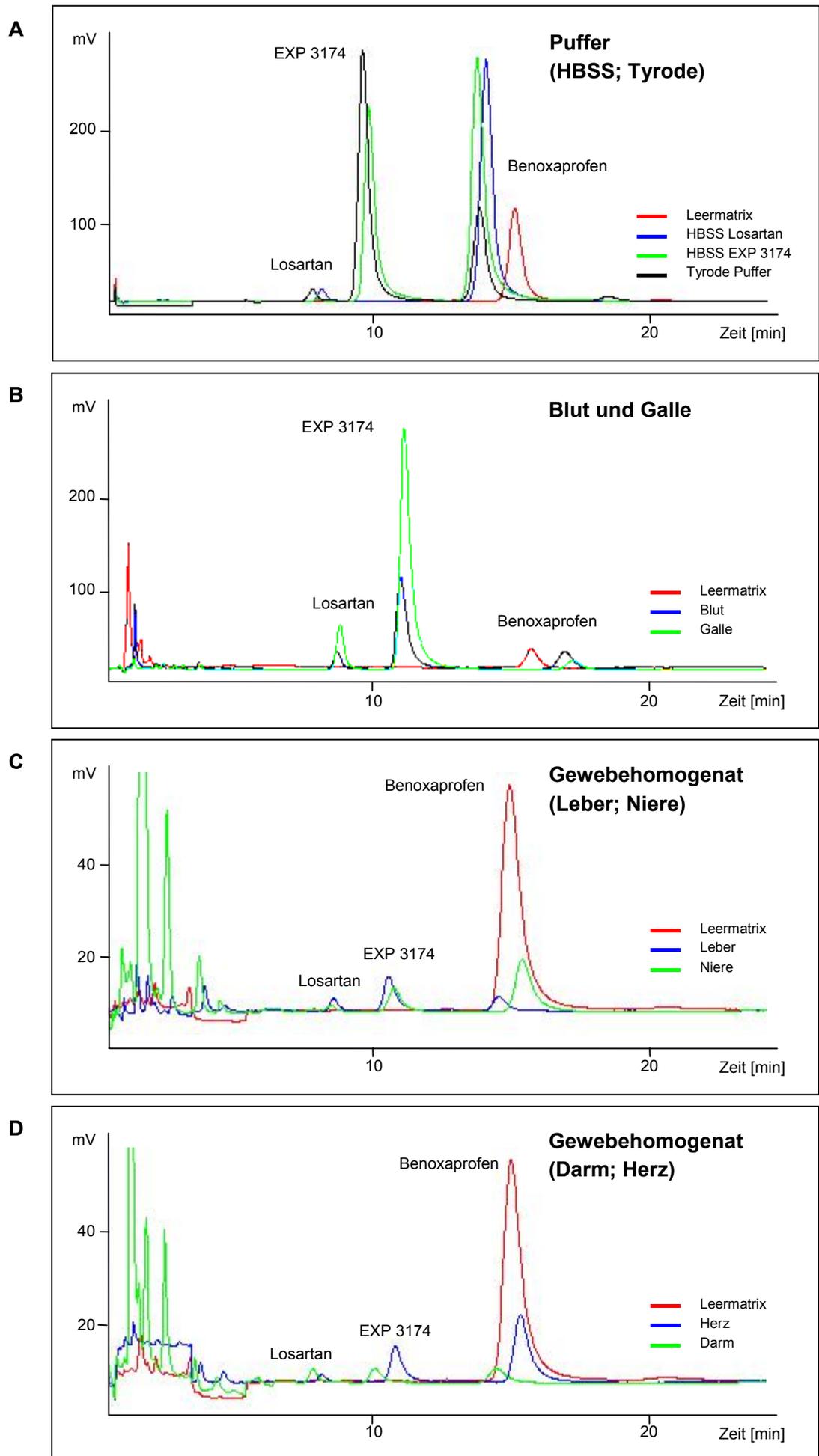


Abbildung 26: Chemische Struktur des Zorbax CN-Säulenmaterials zur chromatographischen Trennung von Losartan, EXP 3174 und Benoxaprofen

Stationäre Phase :	Hauptsäule: Zorbax CN, 5 µm, 150 x 4 mm, Bischoff, Leonberg, Deutschland
	Vorsäule: Phenosphere CN, 5 µm, 60 x 4 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
Mobile Phase :	73% 0,005 M Natriumdihydrogenphosphat
	17,5% Acetonitril (ACN),
	8% Methanol (MeOH),
	4% Tetrahydrofuran (THF)
	Einstellung des pH-Wertes 3,1 mit konzentrierter Phosphorsäure (p.a.)
Druck :	160 kg/cm ² - 170 kg/cm ²
Temperatur :	Raumtemperatur (20°C)
Flußrate :	1,3 ml/min
Elution :	isokratisch
Detektion :	Fluoreszenzdetektion bei den Wellenlängen 280 nm ($\lambda_{Exc.}$) und 380 nm ($\lambda_{Em.}$)
Retentionszeiten :	Losartan 7,75 - 11,83 min
	EXP 3174 8,17 - 15,87 min
	Benoxaprofen 12,01 - 23,59 min

Repräsentative Chromatogramme für die Trennung von Losartan, seinem aktiven Metaboliten EXP 3174 und dem internen Standard Benoxaprofen auf der stationären Phase Zorbax CN sind in Abbildung 27 zusammengestellt.

Abbildung 27: Repräsentative HPLC-Chromatogramme der Trennung von Losartan, EXP 3174 mit dem internen Standard Benoxaprofen in verschiedenen biologischen Matrices (A-D) im Vergleich zur jeweiligen Leermatrix. Die Konzentrationen sowohl von Losartan als auch von EXP 3174 in den abgebildeten Chromatogrammen nahmen in der jeweiligen Matrix folgende Werte an: HBSS 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Tyrode 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Blut 2 $\mu\text{g}/\text{g}$, Galle 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ und in den Homogenaten von Leber 1 $\mu\text{g}/\text{g}$, Niere 0,5 $\mu\text{g}/\text{g}$, Darm 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ und Herz 0,5 $\mu\text{g}/\text{g}$.



5.4.2.2. Probenvorbereitung

5.4.2.2.1. Proben aus In-vitro-Transportstudien

Die Quantifizierung von Losartan und EXP 3174 enthaltenden Proben aus den Transportuntersuchungen basierte auf einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Methyl-tert.-butylether (MTBE). Zu 350 µl Probenvolumen wurden 100 µl methanolische Benoxaprofenlösung (250 ng/ml) als interner Standard gegeben. Nach Ansäuern mit 1,4 ml 2 N HCl und Hinzufügen von 2 ml MTBE wurden die Proben 30 Minuten horizontal geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (15 min) bei 4000 Upm und 4°C. Die organische Phase wurde zum Waschen erneut mit 0,5 ml 0,1 N HCl versetzt, nochmals 30 Minuten horizontal geschüttelt und 15 Minuten bei 4000 Upm; 4°C zentrifugiert. Die so getrennte organische Phase wurde bei 40°C unter Stickstoff eingeengt und der Rückstand in 100 µl mobiler Phase pH 3,1 aufgenommen, erneut zentrifugiert (4000 Upm; 15 min; 4°C) und 75 µl in das HPLC-System injiziert.

5.4.2.2.2. Proben aus In-situ-Untersuchungen

Losartan und EXP 3174 wurden nach Zugabe von 250 µl methanolischer Benoxaprofenlösung (100 ng/ml) als interner Standard, Ansäuern mit 2 ml 1 N HCl aus 250 µl Probe aus den In-situ-Untersuchungen mit 3 ml MTBE extrahiert. Die Proben wurden 30 Minuten horizontal geschüttelt und anschließend 15 Minuten bei 4000 Upm; 4°C zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Die organische Phase wurde in ein neues Gefäß transferiert und mit 0,5 ml 0,1 N HCl gewaschen. Nach 30-minütigem horizontalen Schütteln und Zentrifugieren (4000 Upm; 15 min; 4°C) wurde die organische Phase bei 40°C im Stickstoffstrom eingedampft. Nach Aufnahme des Rückstandes in 100 µl mobiler Phase pH 3,1 wurden die Proben erneut 15 Minuten bei 4000 Upm und 4°C zentrifugiert und 75 µl vom Überstand in das HPLC-System injiziert.

5.4.2.2.3. Proben aus In-vivo-Untersuchungen

Zu 1 g Probenmaterial (Blut bzw. Gewebehomogenat) aus In-vivo-Studien (Verteilungsstudien) wurden 250 µl methanolische Benoxaprofenlösung (100 ng/ml) als interner Standard gegeben. Nach Ansäuern mit 1 ml 1 N HCl und Hinzufügen von 3 ml MTBE werden die Proben 30 Minuten horizontal geschüttelt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter 5.4.2.2.2. beschrieben.

Zur Ausfällung der Gallensäuren wurden 100 µl Probenmaterial aus In-vivo-Studien (Kinetikstudien) mit 30 µl 1 N HCl versetzt. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren (15 min) bei 4000 Upm und 15°C wurde der Überstand quantitativ abgenommen. Zu 130 µl Überstand wurden 500 µl Wasser und 250 µl methanolische Benoxaprofenlösung (100 ng/ml) als interner Standard gegeben. Nach Ansäuern mit 100 µl 1 N HCl und Hinzufügen von 3 ml Methyl-tert.-butylether (MTBE) wurden die Proben 30 Minuten horizontal geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (15 min) bei 4000 Upm und 4°C. In einem anschließenden Waschschritt wurde die organische Phase mit 0,5 ml 0,1 N HCl versetzt und erneut 30 min extrahiert. Nach Zentrifugation (15 min) bei 4000 Upm und 4°C wird die organische Phase im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeengt. Die Aufnahme des Rückstandes erfolgte in 100 µl mobiler Phase pH 3,1. Nach Zentrifugation (15 min) bei 4000 Upm und 4°C wurden 75 µl der Lösung in das HPLC-System injiziert.

5.4.2.3. Validierung

Alle Arbeiten zum Nachweis, dass eine verwendete Methode geeignet ist, zuverlässige und richtige Ergebnisse für die Bestimmung eines Analyten in einer definierten Matrix zu liefern, werden in der Validierung zusammengefasst, die auf der Basis der von Shah (1992, 2001) zusammengefassten Richtlinien der Konferenz „Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies“ und dem Übersichtsartikel von Karnes (1991) durchgeführt wurde. Maßnahmen

zur Qualitätssicherung dokumentieren während der Anwendung, dass dieses Verfahren gleichbleibend zuverlässige Ergebnisse liefert. Der Anwendungsbereich einer analytischen Methode bestimmt die im Rahmen der Validierung zu untersuchenden Eigenschaften, wobei für bioanalytische Methoden Versuchsreihen zur Spezifität, Linearität, Präzision und Richtigkeit von essentieller Bedeutung sind.

In die Validierung der Gewebehomogenate gingen aus ethischen Gründen und geringer Verfügbarkeit von Leermatrix nur Proben aus Leber- und Nierenhomogenaten ein. Für alle weiteren galt die Annahme, dass sie sich ähnlich verhalten, was frühere Studien belegten (Soldner 1996 (1), Fuchs 1999, 2000).

5.4.2.3.1. **Selektivität**

Mit der Selektivität bzw. Spezifität einer Methode wird definiert, inwieweit das Verfahren in Anwesenheit von anderen Substanzen ein Analysensignal liefert, das nur von der Konzentration des Analyten bestimmt wird.

Für die Bestimmung von Losartan und EXP 3174 wurden verschiedene Matrices (z.B. HBSS- und Tyrode-Puffer, Blut, Galle und Gewebehomogenate) verwendet. Die chromatographischen Bedingungen für jede Matrix wurden so optimiert, dass es zu keinen Interferenzen mit dem analytischen Signal des zu untersuchenden Stoffes kam. Für den Fall, dass neben den Analyten gleichzeitig z. B. noch Inhibitoren verschiedener Transportsysteme anwesend waren, wurde die Selektivität in Gegenwart dieser Substanzen bestimmt, wobei weder für Losartan noch für EXP 3174 Interferenzen auftraten.

5.4.2.3.2. **Linearität**

Mit Hilfe der Linearität wird bestimmt, ob das verwendete Analysenverfahren in der Lage ist, ein Signal zu liefern, das der Konzentration des Analyten in der Probe proportional ist.

Für Losartan und EXP 3174 wurde die Linearität der Kalibriergeraden, die 6 Konzentrationen umfasste (Tabelle 19), mit gespikten Proben von Blut, Puffer (HBSS und Tyrode), Gewebehomogenaten (z.B. Leber, Niere) und Galle in dem Konzentrationsbereich von 40-4000 µg/100 µl nachgewiesen. Die mittels ungewichteter linearer Regression ermittelten Steigungen, Achsenabschnitte und Korrelationskoeffizienten sind in der Tabelle 18 mit den SEMs zusammengestellt.

Tabelle 18: Parameter für die verwendeten Kalibrierfunktionen der jeweiligen Matrix nach linearer Regressionsanalyse

(Biologische) Matrix	Konzentrationsbereich	Anstieg	SEM	Achsenabschnitt	SEM	Korrelationskoeffizient	SEM
Losartan							
Blut	40 – 4000 ng/100µl	0,955	0,0406	-0,7374	0,5989	0,9920	0,0052
Galle	25 – 4000 ng/100µl	1,001	0,0126	-1,699	1,4949	0,9953	0,0031
Leber	40 – 4000 ng/100µl	1,004	0,0027	5,718	2,0926	0,9996	0,0001
Niere	40 – 4000 ng/100µl	0,999	0,0001	0,294	0,2689	0,9989	0,0010
HBSS	40 – 4000 ng/100µl	1,008	0,0063	-9,010	1,5908	0,9995	0,0003
Tyrode	40 – 4000 ng/100µl	1,001	0,0003	-3,359	0,8209	0,9994	0,0002
EXP 3174							
Blut	40 – 4000 ng/100µl	1,000	0,0007	-0,721	0,2668	0,9996	0,0001
Galle	25 – 4000 ng/100µl	1,049	0,0240	-3,866	0,3890	0,9975	0,0006
Leber	40 – 4000 ng/100µl	1,008	0,0239	7,822	4,3496	0,9997	0,0002
Niere	40 – 4000 ng/100µl	1,001	0,0003	-2,130	1,0328	0,9995	0,0003
HBSS	40 – 4000 ng/100µl	1,005	0,0019	-5,120	1,0807	0,9997	0,0001
Tyrode	40 – 4000 ng/100µl	1,001	0,0006	-2,284	1,1075	0,9996	0,0001

5.4.2.3.3. Präzision und Richtigkeit

Die Präzision beschreibt die Streuung innerhalb einer Serie von Messungen unter vorgegebenen Bedingungen, wobei zufällige Fehler erfasst werden. Sie wird als relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) in % angegeben.

Der Grad der Übereinstimmung zwischen dem vorgegebenen und dem im Mittel gefundenen Wert wird mit der Richtigkeit beschrieben und als relative Abweichung in % (Bias) angegeben. Ursachen für Abweichungen können systematische Fehler sein.

Die für Losartan und EXP 3174 ermittelte Präzision und Richtigkeit ist in Tabelle 19 angegeben und liegt in den vorgegebenen Grenzen, so dass gezeigt werden konnte, dass beide Stoffe über den Konzentrationsbereich von 40-4000 ng/100µl gut analysierbar sind.

Tabelle 19: Daten zur Präzision und Richtigkeit während des Analysenprozesses für die Bestimmung von Losartan und EXP 3174 in unterschiedlichen, zum Teil biologischen Matrices (n=5)

(Biologische) Matrix	Konzentration [ng/100µl]	Losartan		EXP 3174	
		Präzision [%]	Richtigkeit [%]	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
Blut	4000	1,01	2,40	2,79	-1,20
	2000	3,53	-1,09	1,37	0,13
	1000	4,25	0,97	3,79	2,30
	500	2,21	0,29	5,21	-4,99
	100	6,33	2,01	2,46	1,80
	40	3,06	-1,69	7,32	1,07
Galle	4000	2,65	2,28	1,34	-0,94
	2000	2,15	0,67	7,68	-4,33
	1000	0,10	0,84	2,05	0,34
	500	1,01	-1,14	1,97	0,74
	100	0,66	4,06	2,95	1,73
	40	5,63	-1,03	6,44	16,62
Leber-homogenat 1:1 in Saccharose	4000	1,48	2,28	1,93	-0,70
	2000	5,60	1,05	3,56	-0,69
	1000	1,73	-0,37	1,34	0,18
	500	0,58	1,36	0,73	0,93
	100	1,17	-0,63	5,15	1,19
	40	6,54	-4,52	5,72	-0,98
Nieren-homogenat 1:1 in Saccharose	4000	8,09	-0,05	2,59	-2,04
	2000	1,55	2,11	1,80	2,08
	1000	2,84	3,48	3,26	-2,15
	500	4,29	-1,70	3,67	-1,77
	100	5,11	-3,19	2,47	-0,89
	40	3,81	-7,50	6,08	3,75
HBSS	4000	3,98	2,25	0,88	0,99
	2000	1,37	1,24	1,05	-0,70
	1000	7,11	-1,46	1,55	0,77
	500	2,11	-1,75	1,33	-2,58
	100	4,26	5,91	4,70	0,33
	40	1,35	1,83	12,26	6,83

(Biologische) Matrix	Konzentration [ng/100µl]	Losartan		EXP 3174	
		Präzision [%]	Richtigkeit [%]	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
Tyrode	4000	0,55	1,88	2,70	-2,72
	2000	1,89	-0,56	1,87	-2,80
	1000	3,78	-0,46	3,10	-1,25
	500	1,34	-0,25	3,15	-3,91
	100	1,90	0,67	3,83	-1,99
	40	5,81	3,29	1,72	1,74

5.4.2.3.4. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze einer Methode ist diejenige Konzentration, die noch mit hinreichender Präzision und Richtigkeit ermittelt werden kann. Die kleinste Konzentration der Kalibrierfunktion stellt definitionsgemäß gleichzeitig die Bestimmungsgrenze (Shah 1992, 2001) für die entsprechende Substanz dar, wobei die Präzision einen Wert von 15% nicht überstieg.

Die Nachweisgrenze dagegen ist die kleinste Konzentration, die ein Detektorsignal hervorruft, welches noch mit ausreichender Sicherheit vom Leerwert unterschieden werden kann und größer ist als das dreifache Grundrauschen. Für Losartan und EXP 3174 lag die Nachweisgrenze bei 10 ng/100 µl.

Für Losartan als auch für den aktiven Metaboliten EXP 3174 ergaben sowohl die Bestimmungs- als auch die Nachweisgrenze Werte, die sich für den verwendeten analytischen Bereich als ausreichend erwiesen.

5.4.3. Enantioselektive Bestimmung von Talinolol

5.4.3.1. Chromatographische Bedingungen

Zur chromatographischen Trennung des β -Blockers Talinolol wurde - wie früher beschrieben (Hanafy 2001) - eine chirale stationäre Phase (ChiraSpher NT (Merck, Darmstadt, Deutschland)) verwendet, die aus Silikagelteilchen aufgebaut ist, deren Oberfläche mit Poly(N-acryloyl-S-phenylalaninethylester imprägniert wurde (Abbildung 28).

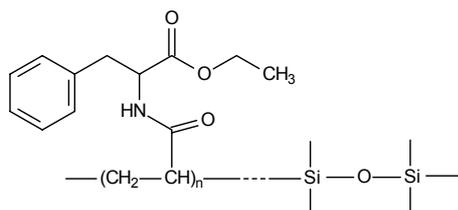


Abbildung 28: Chemische Struktur des ChiraSpher NT-Säulenmaterials zur chiralen chromatographischen Trennung von Talinolol und Pindolol

Stationäre Phase : Hauptsäule: ChiraSpher NT, 5 µm, 250 x 4 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland

 Vorsäule: LiChroCART 4-4, LiChrospher 100 Diol, 5 µm, 4 x 4 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland

Mobile Phase : 1000 ml Ethanol (EtOH)

 0,5 ml Triethylamin

Druck :	170 kg/cm ² - 180 kg/cm ²			
Temperatur :	Raumtemperatur (20°C)			
Flußrate :	0,5 ml/min			
Elution :	isokratisch			
Detektion :	UV-VIS-Detektion bei 245 nm			
Retentionszeiten :	S-Talinolol	15,5 - 16,4 min	R-Talinolol	17,9 - 19,4 min
	S-Pindolol	19,6 - 21,2 min	R-Pindolol	21,1 - 23,3 min

Ein typisches HPLC-Chromatogramm, das sich nach der chiralen Bestimmung von Talinolol und dem internen Standard Pindolol nach Extraktion aus In-situ-Perfusionsproben ergab, ist in Abbildung 29 dargestellt.

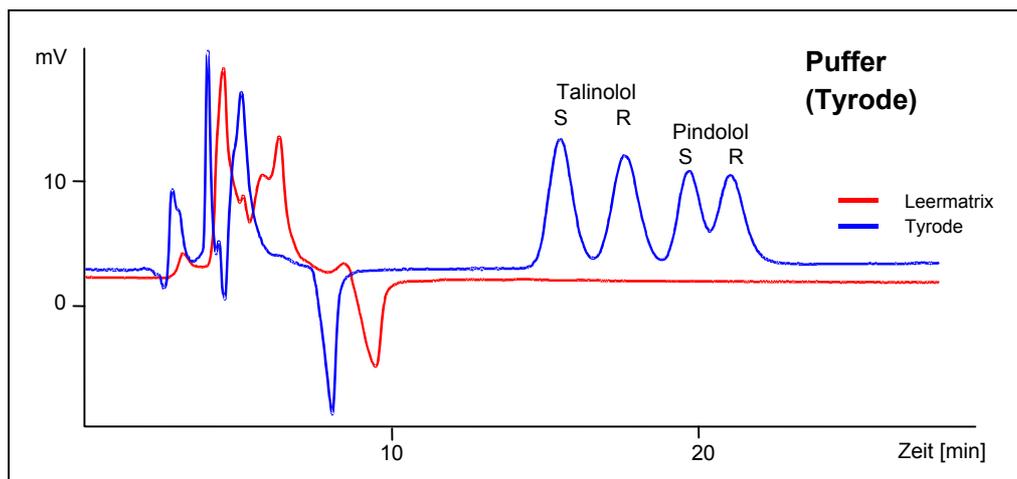


Abbildung 29: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von Talinolol-Enantiomeren und dem internen Standard Pindolol im In-situ-Darmperfusat im Vergleich zur Leermatrix (Konzentration von R- und S-Talinolol betrug jeweils 200 ng/ml)

5.4.3.2. Probenvorbereitung

5.4.3.2.1. Proben aus In-situ-Untersuchungen

Talinolol wurde mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (Dichlormethan/Isopropanol, 95:5, v/v; 2 ml) nach Zugabe des internen Standards R/S-Pindolol (2000 ng/50 µl) in 100 µl Perfusat-Probe bestimmt. Nach Addition von 0,1 ml 1 M NaOH und horizontalem Schütteln (15 Minuten) wurde die Phasentrennung durch Zentrifugation (2500 Upm; 5 min; 4°C) erreicht. In einem nachfolgenden Waschschrift wurde die organische Phase mit 0,5 ml 0,1 M NaOH versetzt und wiederholt 15 Minuten extrahiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (2500 Upm; 5 min; 4°C), anschließend wurde die organische Phase separiert und im Stickstoffstrom bei 40°C eingedampft. Der Rückstand wurde in 75 µl Methanol aufgenommen, erneut zentrifugiert und davon 50 µl zur quantitativen Bestimmung in das HPLC-System injiziert.

5.4.3.3. Validierung

Die Validierungsdaten entsprechen den von Hanafy (2001) beschriebenen. Die Nachweisgrenzen für S- und R-Talinolol betragen jeweils 2 ng/ml und die Standardabweichung bei einer Konzentration von 100 ng/ml (raz. Konzentration) 1,72%.

5.5. Statistische Auswertung

In der gesamten Arbeit sind die Daten als arithmetische Mittel und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Im Rahmen der Untersuchungen zur intestinalen Permeabilität im Steady-state (In-situ-perfundierter Rattendarm) wurde eine Prüfung der Zufälligkeit einer Folge von Messwerten durchgeführt. Hierzu wurden der Vorzeichen-Trendtest von Cox und Stuart (Sachs 1992) und der Phasenhäufigkeitstest von Wallis und Moore durchgeführt, bei dem es sich um einen Differenzenvorzeichen-Iterationstest handelt. Als kritischer Wert für den Nachweis eines ansteigenden oder abfallenden Trends galt in beiden Fällen $P < 0,05$ (5%). In den entsprechenden Datentabellen und Ergebnisbeschreibungen wurde auf diese Prüfung nur in den Fällen hingewiesen, wo ein statistisch signifikantes Ergebnis gefunden worden ist.

Bei den durchgeführten In-situ- und In-vivo-Studien war die Fallzahl häufig nicht höher als 3-6. Da die Untersuchung der Varianzen keinen Hinweis auf Ungleichheit ergeben hatte, wurde der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Zufallsstichproben zum statistischen Vergleich der Mittelwerte der beiden Grundgesamtheiten herangezogen. Für den t-Test nach Student (zweiseitig, ungepaart) wurden Unterschiede zwischen den Mittelwerten dann als statistisch signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit mindestens $P < 0,05$ betrug ($P < 0,05$ (*); $P < 0,01$ (**)). Handelte es sich um abhängige („verbundene“) Daten (z.B. In-situ-Perfusion mit und ohne Inhibitor), wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Paardifferenzen-Test herangezogen. Auch hier wurde bei $P < 0,05$ von einer statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen den Mittelwerten ausgegangen.

6. Zusammenfassung

Seit langem ist bekannt, dass ein starker intestinaler Metabolismus zu einer geringen und variablen Bioverfügbarkeit beitragen kann. Aber nicht allein der Metabolismus, sondern auch die aktive Sekretion durch Transporter, wie z.B. durch den ABC-Transporter P-GP, sind ggf. maßgeblich für eine limitierte orale Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen verantwortlich.

Der exsorptive und membrangebundene Multidrugtransporter P-GP ist seit längerer Zeit bekannt und wird mit der Multidrug-Resistenz in Tumoren assoziiert, die mit einem Anstieg des Effluxes von Arzneistoffen aus dem Zellinneren in den Extrazellularraum verbunden ist und zu einem geringeren Ansprechen der Chemotherapie führt. Zusätzlich zum Auftreten im intestinalen Gewebe ist P-GP außerdem in verschiedenen anderen nicht-pathologischen Geweben, wie Leber, Niere und Gehirn (Blut-Hirn-Schranke) präsent und trägt bei zu einer Barrierefunktion bestimmter Membranen.

Losartan, die Leitsubstanz der nichtpeptidergen Angiotensin-II-Antagonisten, einer neuen Klasse von Antihypertonika, zeigt eine geringe Bioverfügbarkeit (33%) und wird in vivo durch oxidative Biotransformation zu dem aktiven 5-Carbonsäuremetaboliten EXP 3174 biotransformiert. Für diesen metabolischen Weg, der in zwei Schritten abläuft, ist die Oxidation von Losartan zum intermediären Aldehyd E3179 der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und wird durch die CYP3A4- und CYP2C9-Isoformen katalysiert, während die daraus gebildete Carbonsäure nur über CYP2C9 gebildet wird. EXP 3174 trägt ebenso wie Losartan zu dem antihypertensiven Effekt bei, da es eine höhere Rezeptoraffinität in vitro (10-fach höher) und in vivo eine längere terminale Halbwertszeit als Losartan besitzt.

Frühere Kinetikstudien an Ratten zeigten aber auch, dass nach wiederholter peroraler Gabe der Muttersubstanz höhere Konzentrationen des aktiven Metaboliten im Darm auftraten, die die Konzentrationen des Losartans überschritten. Da in diesen Studien auch die terminale Halbwertszeit für EXP 3174 im Vergleich zu Losartan länger war, wurde angenommen, dass die erhöhten intestinalen EXP 3174-Konzentrationen aus einem induzierbaren intestinalen Metabolismus und der Rückresorption des Metaboliten (nach Bildung, z.B. in der Leber und Sekretion in das Darmlumen) resultieren, und postuliert, dass dies der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im kinetischen Gesamtprofil von EXP 3174 sein könnte. Demzufolge sollte auch ein intestinaler exsorptiver Transport das pharmakokinetische Profil beeinflussen.

Im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen wurden verschiedene Studien durchgeführt, die zum Ziel hatten

- ⇒ in Transportstudien mit Caco-2-Zellen, zum Einen für Modellsubstanzen verschiedener aktiver und passiver epithelialer Transportsysteme, aber auch für Losartan und EXP 3174 den Einfluss experimenteller Bedingungen auf die intestinale Permeabilität zu untersuchen. Speziell für die Angiotensin-II-Antagonisten sollte zusätzlich geprüft werden, ob der intestinale Transport eine Richtungsabhängigkeit aufweist, aus der auf einen aktiven Carrier-vermittelten Transport geschlossen werden kann.
- ⇒ den Einfluss von Inhibitoren intestinaler Transportsysteme auf die Permeabilität von Losartan und EXP 3174 in vitro und in situ zu testen. Im Bindungsassay sollten beide Stoffe hinsichtlich ihrer Affinität zum ABC-Transporter P-GP (vergleichend mit anderen Modellsubstanzen) geprüft werden und in Verteilungsstudien nach separater i.v.- bzw. p.o.-Gabe getestet werden, ob der P-GP-Modulator Verapamil das Absorptionsverhalten sowie die Gewebeverteilung beider Substanzen verändern kann.
- ⇒ in vivo Hinweise über die Relevanz von intestinaler und biliärer Sekretion zu erhalten und demzufolge in pharmakokinetischen Untersuchungen an Gallengangs-kanülierten und nichtkanülierten Ratten nach separater Applikation von Losartan bzw. EXP 3174 die kinetischen Parameter beider Substanzen zu vergleichen und den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der EXP 3174-Kinetik zu bestimmen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde in In-vitro-Studien nachgewiesen, dass die Kulturperiode und Kulturfläche der Caco-2-Zellen (Monolayer) einen Einfluss auf den TEER der Monolayer besitzen, jedoch zu keiner

Veränderung in der Permeabilität von parazellulär absorbierten Modellschubstanzen (Atenolol, Mannitol) führen. Der lipophile P-GP-Modulator Verapamil führt sowohl zu einer Veränderung des TEER der Monolayer als auch der intestinalen Permeabilität des parazellulär absorbierten Mannitols. Im Vergleich dazu zeigten Modellschubstanzen, die über aktive Aufnahmesysteme (z.B. PepT1) in das Zellinnere absorbiert werden, mit zunehmender Kulturzeit höhere Permeabilitäten (L-Phenylalanin, Gly-Pro), für P-GP-relevante Transportprozesse resultierten jedoch nahezu konstante P_{eff} -Werte (Talinolol) mit Tendenz zu einer Reduktion.

Transportuntersuchungen mit den Angiotensin-II-Antagonisten ergaben eine deutliche Richtungsabhängigkeit des Transportprozesses ($a-b < b-a$) und eine Beeinflussung durch den P-GP-Inhibitor Verapamil, wobei die Permeabilität der Mutterschubstanz stets höher war als die des Metaboliten.

Wie bei den In-vitro-Transportstudien wurde auch in In-situ-Perfusionsstudien nachgewiesen, dass aktive Transporter wie P-GP, MRP1 und cMOAT in der Lage sind, die intestinale Permeabilität von Losartan und EXP 3174 zu beeinflussen. Eine Coperfusion von EXP 3174 mit Losartan führte aber nicht zu einer Interaktion. Die Effekte bei Transporthemmung waren bei nahezu allen Inhibitoren im Falle der Mutterschubstanz stärker ausgeprägt als bei dem aktiven Metaboliten EXP 3174, lediglich bei Coperfusion mit Benzoesäure konnte nur bei der Carbonsäure EXP 3174 ein Effekt nachgewiesen werden, die Permeabilität des Alkohols Losartan hingegen blieb unbeeinflusst.

Untersuchungen, ob die intestinale Permeabilität tageszeitlichen Schwankungen unterliegt, zeigten für Losartan und auch für das P-GP-Modellschubstrat Talinolol in der Nacht einen deutlichen Anstieg der Transporteraktivität, die sich in einer Abnahme der Permeabilität äußerte.

Die in den Kinetikstudien ermittelten Schlüsselparameter ergaben für den aktiven Metaboliten nach intravenöser Applikation kürzere terminale Halbwertszeiten als nach peroraler Gabe des Metaboliten bzw. des Präcursors Losartan. Es wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den Halbwertszeiten für EXP 3174 nach peroraler EXP 3174-Applikation oder i.v.- und p.o.-Gabe von Losartan gefunden. Aus den erhaltenen Blut-Konzentrations-Zeit-Profilen konnten nach separater Applikation der Schubstanzen eine Gesamtclearance von 1,7 ml/min für Losartan und 5,9 ml/min für EXP 3174 ermittelt werden. Die durchschnittliche systemische Verfügbarkeit nach peroraler Gabe betrug 33% für Losartan und 19% für EXP 3174, wobei in beiden Studien die Werte für die Versuchstiere mit Gallengangsdrainage niedriger waren. Die Werte für C_{max} und t_{max} waren nach separater Applikation des Metaboliten deutlich niedriger als nach Losartangabe. Es konnte nachgewiesen werden, dass etwa 4,7% der Losartan- und 35% der EXP 3174-Dosis nach i.v.- und 6,7% der Losartan- und 3,4% der EXP 3174-Dosis nach p.o.-Gabe als EXP 3174 in der Galle ausgeschieden werden. Da die gesamte intestinale Permeabilität von EXP 3174 sehr gering ist, sollte in der Tat die Absorption oder Rückresorption nach biliärer Sekretion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein, was zweifelsfrei auch durch die kürzeren Halbwertszeiten von EXP 3174 nach dessen intravenöser Applikation bei Gallengangs-kanülierten Ratten bestätigt wird.

In dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Bindungsassay wurde sowohl für EXP 3174 als auch für Losartan eine P-GP-Affinität nachgewiesen.

Der P-GP-Ligand Verapamil, der sich durch hohe Affinität zum P-GP und deutliche Sekretionshemmung bei Caco-2-Zellmonolayern auszeichnet, zeigte im In-situ-Perfusionsmodell allerdings einen geringeren Effekt und ebenso in vivo lediglich eine geringe Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Losartan. Somit scheint in Bezug auf Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen auf Absorptionsebene die In-situ-Perfusion den besten prädiktiven Wert für In-vivo-Verhältnisse zu haben.

Weitere wichtige Ergebnisse aus der Arbeit, die im Rahmen der Optimierung von Methoden erhalten wurden, sind die Weiterentwicklung des P-GP-Bindungsassays, die Abhängigkeit der Expression verschiedener Transporter von der Kulturzeit sowie die unterschiedliche Permeabilität und Transporteraktivität in der Ruhe- und Aktivitätsphase bei der Ratte.

7. Literaturverzeichnis

- Adson A., Burton P.S., Raub T.J., Barsuhn C.L., Audus K.L. und Ho N.F.H.** Passive diffusion of weak organic electrolytes across Caco-2 cell monolayers: Uncoupling the contributions of hydrodynamic, transcellular and paracellular barriers. *J Pharm Sci* 1995; **84**: 1197-206.
- Akarawut W., Lin C.J. und Smith D.E.** Noncompetitive inhibition of glycylsarcosine transport by quinapril in rabbit renal brush-border membrane vesicles: Effect on high-affinity peptide transporter. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **287**: 684-690.
- Amidon G.L. und Walgreen C.R.J.R.** 5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PepT1 peptide transporter. *Pharm Res* 1999; **16**: 175-179.
- Anderle P., Niederer E., Rubas W., Hilgendorf C., Spahn-Langguth H., Wunderli-Allenspach H., Merkle H.P. und Langguth P.** P-Glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: The influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels. *J Pharm Sci* 1998; **87**: 757-762.
- Artursson P. und Karlsson J.** Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **175**: 880-885.
- Asghar A., Gorski J.C., Haehner-Daniels B. und Halle S.D.** Induction of multidrug resistance-1 and cytochrome P450 mRNAs in human mononuclear cells by rifampin. *Drug Metab Dispos* 2002; **30**: 20-26.
- Aungst B.J.** Novel formulation strategies for improving oral bioavailability of drugs with poor membrane permeation or presystemic metabolism. *J Pharm Sci* 1993; **82**: 979-987.
- Azizi M.** Additive effects of losartan and enalapril on blood pressure and plasma active renin. *Hypertension* 1997; **29**: 634-640 (1).
- Azizi M.** Pharmacological demonstration of the additive effects of angiotensin-converting-enzyme inhibition and angiotensin II antagonism in sodium depleted healthy subjects. *Clin Exp Hypertens* 1997; **19**: 937-951 (2).
- Bakos E., Hegedüs T., Hollo Z., Welker E., Tusnady G.E., Zaman G.J.R., Flens M.J., Varadi A. und Sarkadi B.** Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* 1996; **271**: 12322-12326.
- Balimane P.V., Tamai I., Guo A., Nakanishi T., Kitada H., Leibach F.H., Tsuji A. und Sinko P.J.** Direct evidence for peptide transporter (PepT1)-mediated uptake of a nonpeptide prodrug, valacyclovir. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **250**: 246-251.
- Benet L.Z., Izumi T., Zhang Y., Silverman J.A. und Wachter V.J.** Intestinal MDR transport protein and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Contr Rel* 1999; **62**: 25-31.
- Bjarnson I., Macpherson A. und Hollander D.** Intestinal permeability: An overview. *Gastroenterol* 1995; **108**: 1566-1581.
- Boisset M., Botham R.P., Haegele K.D., Lenfant B. und Pachot J.I.** Absorption of angiotensin II antagonists in Ussing chambers, Caco-2, perfused jejunum loop and in vivo: Importance of drug ionisation in the in vitro prediction of in vivo absorption. *Eur J Pharm Sci* 2000; **10**: 215-224.
- Boll M., Markovich D., Weber W.M., Korte H., Daniel H. und Murer H.** Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton coupled transport of peptides, beta-lactam antibiotics, and ACE-inhibitors. *Pfluegers Arch* 1994; **429**: 146-149.
- Bouley R., Perodin J., Plante H., Rihakova L., Bernier S.G., Maletinska L., Guillemette G. und Escher E.** N- and T-terminal structure-activity study of angiotensin II on the angiotensin AT₂ receptor. *Eur J Pharmacol* 1998; **343**: 323-331.
- Bretschneider B., Brandsch M. und Neubert R.** Intestinal transport of beta-lactam antibiotics: Analysis of the affinity at the H⁺/peptide symporter (PepT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux. *Pharm Res* 1999; **16**: 55-61.
- Burnier M., Buclin T., Biollaz J., Nussberger J., Waeber B. und Brunner H.** Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of three angiotensin II receptor antagonists in normal volunteers. *Kidney Int* 1996; **49**: 24-29.

- Burton P.S., Conradi R.A. und Hilgers A.R.** Mechanisms of peptide and protein absorption: Transcellular mechanisms peptide and protein absorption: Passive aspects. *Adv Drug Deliv Rev* 1991; **7**: 365-386.
- Carr A.A. und Prisant L.M.** Losartan: First of a new class of angiotensin antagonists for the management of hypertension. *J Clin Pharmacol* 1996; **36**: 3-12.
- Chang R.S.L. und Lotti V.J.** Two distinct angiotensin II receptor binding sites in adrenal revealed by new selective nonpeptide ligands. *Mol Pharmacol* 1990; **29**: 347-351.
- Chen C.J., Chin J.E., Ueda K., Clark D.P., Pastan I., Gottesman M.M. und Roninson I.B.** Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986; **47**: 381-389.
- Chiu A.T., Herblin W.F., Ardecky R.J., McCall D.E., Carini D.J., Duncia J.V., Pease L.J., Wexler R.R., Wong P.C., Johnson A.L. und Timmermans P.B.M.W.M.** Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **165**: 196-203.
- Chiu A.T., McCall D.E., Price W.A., Wong P.C., Carini D.J., Duncia J.V., Wexler R.R., Yoo S.E., Johnson A.L. und Timmermans P.B.M.W.M.** Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VII. Cellular and biochemical pharmacology of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; **252**: 711-718.
- Christ D.D.** Human plasma protein binding of the angiotensin II receptor antagonist losartan potassium (DuP 753/MK 954) and its pharmacologically active metabolite EXP 3174. *J Clin Pharmacol* 1995; **35**: 515-520.
- Christ D.D., Wong P.C., Wong Y.N., Hart S.D., Quon C.Y. und Lam G.N.** The pharmacokinetics and pharmacodynamics of the angiotensin II receptor antagonist losartan potassium (DuP 753/MK 954) in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; **268**: 1199-1205.
- Christen Y., Waeber B., Nussberger J., Porchet M., Borland R.M., Lee R.J., Maggon K., Shum L., Timmermanns P.B.M.W.M. und Brunner H.R.** Oral administration of DuP 753, a specific angiotensin II receptor antagonist, to normal male volunteers. *Circulation* 1991; **83**: 1333-1342.
- Chung O. und Unger T.** Pharmacology of angiotensin receptors and AT₁ receptor blockers. *Basic Res Cardiology* 1998; **93**: 15-23.
- Cole S.P.C., Bhardway G., Gerlach J.H., Mackie J.E., Grant C.E., Almquist K.C., Stewart A.J., Kurtz E.U., Duncan A.M.V. und Deeley G.G.** Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; **258**: 1650-1654.
- Collares-Buzato C.B., McEwan G.T., Jepson M.A., Simons N.L. und Hirst B.H.** Paracellular barrier and junctional protein distribution depend on basolateral extracellular Ca²⁺ in cultured epithelia. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1222**: 147-158.
- Collett A., Walker D., Sims E., He Y.-L., Speers P., Ayrton J., Rowland M. und Warhurst G.** Influence of morphometric factors on quantitation of paracellular permeability of intestinal epithelia in vitro. *Pharm Res* 1997; **14**: 767-773.
- Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Boccia J., Casals D., Bertino J.R. und Melamed M.R.** Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 1990; **38**: 1277-1287.
- Crocker L.S. und McCauley J.A.** Solubilities of losartan polymorphs. *Die Pharmazie* 1997; **52**: 72.
- Crozier I., Ikram H., Awan N., Cleland J., Stephen N., Dickstein K., Frey M., Young J., Klinger G., Makris L. und Rucinska E.** Losartan in heart failure. *Circulation* 1995; **91**: 691-697.
- Csajka C., Buclin T., Brunner H.R. und Biollaz J.** Pharmacokinetic-pharmacodynamic profile of angiotensin II receptor antagonists. *Clin Pharmacokin* 1997; **32**: 1-29.
- Dahlöf B., Keller S.E. und Makris L.** Efficacy and tolerability of losartan potassium and atenolol in patients with mild to moderate essential hypertension. *Am J Hypertens* 1995; **8**: 578-83.
- Daniel H.** Function and molecular structure of brush-border membrane peptide/H⁺-symporters. *J Membr Biol* 1996; **154**: 197-203.
- Daniel H. und Adibi S.A.** Transport of beta-lactam antibiotics in kidney brush-border membrane: Determinants of the affinity for the oligopeptide/H⁺-symporter. *J Clin Invest* 1993; **92**: 2215-2223.
- Daniel H. und Herget M.** Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport. *Am J Physiol* 1997; **273**: F1-F8.
- Dantzig A.H., Shepard R.L., Cao J., Law K.L., Ehlhardt W.J., Baughman T.M., Bumol T.F. und Starling J.J.** Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropyldibenzosuberane modulator LY335979. *Cancer Res* 1996; **56**: 4171-4179.

- de Gasparo M., Catt K.J., Inagami T., Wright J.W. und Unger T.** International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; **52**: 415-472.
- DeGraaf G.L., Pals D.T., Couch S.J. und Lawson J.A.** Hormonal and cardiovascular effects of Losartan (DuP 753), an angiotensin receptor antagonist, in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; **264**: 6-10.
- Delahunty T. und Hollander D.A.A.** Comparison of intestinal permeability between humans and three common laboratory animals. *Comp Biochem Physiol* 1987; **86A**: 565-567.
- Doig J.K., MacFayden R.J., Sweet C.S. und Reid J.L.** Haemodynamic and renal responses to oral losartan potassium during salt depletion or salt repletion in normal human volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; **25**: 511-517.
- Doluisio J.T., Billups N.F., Dittert L.W., Sugita E.T. und Swintosky J.V.** Drug absorption. I. An in situ gut technique yielding realistic absorption rates. *J Pharm Sci* 1969; **58**: 1196-1200.
- Döppenschmitt S., Spahn-Langguth H., Regardh C.G. und Langguth P.** Radioligand-binding-assay employing P-glycoprotein-overexpressing cells: Testing drug affinities to the secretory intestinal multidrug transporter. *Pharm Res* 1998; **15**: 1001-1006.
- Dresser G.K., Bailey D.G., Leake B.F., Schwarz U.I., Dawson P.A., Freeman D.J. und Kim R.B.** Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **71**: 11-20.
- Dressler C.** Losartan und sein aktiver Metabolit EXP 3174: Ermittlung von partiellen Clearances in vitro und in vivo an der Ratte. *Diplomarbeit* Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Halle 1997.
- Dutt A., Heath L.A. und Nelson J.A.** P-Glycoprotein and organic cation secretion by the mammalian kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; **269**: 1254-1260.
- Edwards R.M.** Interaction of non-peptide angiotensin II receptor antagonists with the urate transporter in rat renal brush-border membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; **276**: 125-129.
- Edwards R.M., Stack E. und Trizna W.** Transport of ³H-losartan across isolated perfused rabbit proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **290**: 38-42.
- Endicott J.A. und Ling V.** The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Ann Rev Biochem* 1989; **58**: 137-171.
- Fagerholm U., Johansson M. und Lennernäs H.** Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharm Res* 1996; **13**: 1336-1342.
- Fei Y.J., Kanai Y., Nussberger S., Ganapathy V., Leibach F.H., Romero M.F., Singh S.K., Boron W.F. und Hediger M.A.** Expression cloning of mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* 1994; **368**: 563-566.
- Flanagan S.D. und Benet L.Z.** Net secretion of furosemide is subject to indomethacin inhibition, as observed in Caco-2 monolayers and excised rat jejunum. *Pharm Res* 1999; **16**: 221-224.
- Ford J.M. und Hait W.N.** Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev* 1990; **42**: 155-199.
- Fuchs B.** Pharmacokinetic-pharmacodynamic-correlation of candesartan cilexetil, an angiotensin-II-receptor antagonist. *Shaker Verlag GmbH Aachen* 1999.
- Fuchs B., Breithaupt-Grögler K., Belz G.G., Roll S., Malerczyk C., Herrmann V., Spahn-Langguth H. und Mutschler E.** Comparative pharmacodynamics and pharmacokinetics of candesartan and losartan in man. *J Pharm Pharmacol* 2000; **52**: 1075-1083.
- Furtek C.I. und Lo M.W.** Simultaneous determination of a novel angiotensin II receptor blocking agent, losartan, and its metabolite in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1992; **573**: 295-301.
- Gan L.S.L. und Thakker D.R.** Applications of the Caco-2 model in the design and development of orally active drugs: Elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; **23**: 77-98.
- Ganapathy M.E., Huang W., Rajan D.P., Carter A.L., Sugawara M., Iseki K., Leibach F.H. und Ganapathy V.** Beta-lactam antibiotics as substrates for OCTN2, an organic cation/carnitine transporter. *J Biol Chem* 2000; **275**: 1699-1707.
- Ganapathy M.E., Huang W., Wang G.H., Ganapathy V. und Leibach F.H.** Valacyclovir: A substrate for the intestinal and renal peptide transporters PepT1 and PepT2. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **246**: 470-475.

- Gao M., Yamazaki M., Loe D.W., Westlake C.J., Grant C.E., Cole S.P.C. und Deeley R.G.** Multidrug resistance protein: Identification of regions required for active transport of leucotriene C₄. *J Biol Chem* 1998; **273**: 10733-10740.
- Garcia C.K., Li X., Luna J. und Francke U.** cDNA cloning of the human monocarboxylate transporter 1 and chromosomal localization of the SLC16A1 locus to 1p13.2-p12. *Genomics* 1994; **23**: 500-503.
- Gatmaitan Z.C. und Arias I.M.** Structure and function of P-glycoprotein in normal liver and small intestine. *Adv Pharmacol* 1993; **24**: 77-97.
- Gerhart D.Z., Enerson B.E., Zhdankina O.Y., Leino R.L. und Drewes L.R.** Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *Am J Physiol* 1997; **273**: E207-E213.
- Gerhart D.Z., Enerson B.E., Zhdankina O.Y., Leino R.L. und Drewes L.R.** Expression of the monocarboxylate transporter MCT2 by rat brain glia. *Glia* 1998; **22**: 272-281.
- Giacomini K.M.** Membrane transporters in drug disposition. *J Pharmacokinet Biopharm* 1997; **25**: 731-741.
- Goa K.L. und Wagstaff A.J.** Losartan potassium: A review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of hypertension. *Drugs* 1996; **51**: 820-845.
- Goldberg M.R., Bradstreet T.E., McWilliams E.J., Tanaka W.K., Lipert S., Bjornsson T.D., Waldman S.A., Osborne B., Pivadori L., Lewis G., Blum R., Herman T., Abraham P.A., Halstenson C.N., Lo M.W., Lu H. und Spector R.** Biochemical effects of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive patients. *Hypertension* 1995; **25**: 37-46.
- Goldberg M.R., Lo M.W. und Deutsch P.J.** Phenobarbital minimally alters plasma concentrations of losartan and its active metabolite E-3174. *Clin Pharmacol Ther* 1996; **59**: 268-274.
- Goldberg M.R., Tanaka W., Barchowsky A., Bradstreet T.E., McCrear J., Lo M.W., McWilliams Jr. E.J. und Bjornsson T.D.** Effects of losartan on blood pressure, plasma renin activity and angiotensin II in volunteers. *Hypertension* 1993; **21**: 704-713.
- Goodfriend T.L., Elliott M.E. und Catt K.J.** Angiotensin receptors and their antagonists. *N Engl J Med* 1996; **334**: 1649-1653.
- Gorboulev V., Ulzheimer J.C., Akhoundova A., Ulzheimer-Teuber I., Karbach U., Quester S., Baumann C., Lang F., Busch A.E. und Koepsel H.** Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* 1997; **16**: 871-881.
- Gotoh Y., Suzuki H., Kinoshita S., Hirohashi T., Kato Y. und Sugiyama Y.** Involvement of organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **292**: 433-439.
- Gottesman M.M. und Pastan I.** Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993; **62**: 385-427.
- Gramatte T. und Oertel R.** Intestinal secretion of intravenous talinolol is inhibited by luminal R-verapamil. *Clin Pharmacol Ther* 1999; **66**: 239-245.
- Grass G.M.** Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; **23**: 199-219.
- Gründemann D., Gorboulev V., Gabaryan S., Veyhl M. und Koepsell H.** Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 1994; **372**: 549-552.
- Guo A., Hu P., Balimane P.V., Leibach F.H. und Sinko P.J.** Interactions of a nonpeptidic drug, valacyclovir, with the human intestinal peptide transporter (hPepT1) expressed in a mammalian cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **289**: 448-454.
- Guo A., Marnaro W., Hu P. und Sinko P.J.** Delineating the contribution of secretory transporters in the efflux of etoposide using Madin-Darbin Canine Kidney (MDCK) cells overexpressing P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated protein (MRP1) and canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT). *Drug Metab Dispos* 2002; **30**: 457-463.
- Halestrap A.P. und Price N.T.** The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: Structure, function and regulation. *Biochem J* 1999; **343**: 281-299.
- Hallek M. und Emmerich B.** Chronobiologische Onkologie. *Münch Med Wschr* 1990; **132**: 647-650.
- Hanafy A.** Transport inhibition and induction as sources for absorption- and disposition-related drug-drug interactions: Talinolol as model substrate for the ABC-transporter P-glycoprotein. *Dissertation* Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Halle 2001.
-

- Heinzel G., Woloszczak R. und Thomann P.** TopFit: Version 2.0: Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis system for the PC. *Gustav Fischer Verlag Stuttgart*, 1993.
- Hendrikse N.H., Franssen E.J.F., van der Graaf W.T.A., Vaalburg W. und de Vries E.G.E.** Visualization of multidrug resistance in vivo. *Eur J Nuclear Med* 1999; **26**: 283-293.
- Hidalgo I.J., Bhatnager P., Lee C.P., Miller J., Cucullino G. und Smith P.L.** Structural requirements for interaction with oligopeptide transporter in Caco-2 cells. *Pharm Res* 1995; **12**: 317-319.
- Hidalgo I.J., Raub T.J. und Borchardt R.T.** Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterol* 1989; **96**: 736-749.
- Higgins C. und Gottesman M.M.** Is the multidrug transporter a flippase? *TIBS* 1992; **17**: 18-21.
- Hilgendorf C.** The intestinal epithelial barrier in vitro: Carrier-mediated and passive transport in normal and genetically modified Caco-2 cells and other intestinal cell lines. *Dissertation* Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Halle 1999.
- Hilgendorf C., Spahn-Langguth H., Regardh C.G., Lipka E., Amidon G.L. und Langguth P.** Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: Permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J Pharm Sci* 2000; **89**: 63-75.
- Hillgren K.M., Kato A. und Borchardt R.T.** In vitro systems for studying drug absorption. *Med Res Rev* 1995; **15**: 83-109.
- Hipfner D.R., Almquist K.C., Leslie E.M., Gerlach J.H., Grant C.E., Deeley R.G. und Coole S.P.C.** Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP): A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH₂ terminus. *J Biol Chem* 1997; **272**: 23623-23630.
- Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O., Arnold H.P., Brockmöller J., Johné A., Cascorbi L., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M. und Brinkmann U.** Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *PNAS* 2000; **97**: 3473-3478.
- Horiuchi M., Akishita M. und Dzau V.J.** Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999; **33**: 613-621.
- Hu M. und Borchardt R.T.** Mechanism of L-alpha-methyldopa transport through a monolayer of polarized human intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Res* 1990; **7**: 1313-1319.
- Hunter J. und Hirst B.H.** Intestinal secretion of drugs: The role of P-glycoprotein and related efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; **25**: 129-157.
- Hunter J., Hirst B.H. und Simons N.L.** Transepithelial vinblastine secretion mediated by P-glycoprotein is inhibited by forskolin derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **181**: 902-910.
- Hunter J., Jepson M.A., Tsuruo T., Simons N.L. und Hirst B.H.** Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. *J Biol Chem* 1993; **268**: 14991-14997.
- Hunyady L., Balla T. und Catt K.J.** The ligand binding site of the angiotensin AT₁ receptor. *TIPS* 1996; **17**: 135-140.
- Inui K., Okano T., Takano M., Saito H. und Hori R.** Carrier-mediated transport of cephalexin via the dipeptide transport system in rat renal brush-border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1984; **679**: 449-454.
- Inui K., Tomia Y., Katsura T., Ookano T., Takano M. und Hori R.** H⁺-Coupled active transport of bestatin via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **260**: 482-486.
- Inui K., Yamamoto M. und Saito H.** Transepithelial transport of oral cephalosporines by monolayers of intestinal epithelial cell line Caco-2: Specific transport systems in apical and basolateral membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **261**: 195-201.
- Ito K., Iwatsubo T., Kanamitsu S., Najajima Y. und Sugiyama Y.** Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from the in vitro data on metabolism, together with binding and transport. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; **38**: 461-499.
- Ito K., Suzuki H., Hirohashi T., Kume K., Shimizu T. und Sugiyama Y.** Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am J Physiol* 1997; **272**: G16-G22.
- Jackson V.N. und Halestrap A.P.** The kinetics, substrate and inhibitor specificity of the monocarboxylate (lactate) transporter of rat liver cells determined using the fluorescent intracellular pH indicator, 2',7'-Bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein. *J Biol Chem* 1996; **271**: 861-868.

- Jedlitschky G., Leier I., Buchholz U., Center M. und Keppler D.** ATP-Dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res* 1994; **54**: 4833-4836.
- Ji H., Leung M., Zhang Y., Catt K.J. und Sandberg K.** Differential structural requirements for specific binding of nonpeptide and peptide antagonists to the AT₁ angiotensin receptor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 16533-16536.
- Jodoin J., Demeule M. und Beliveau R.** Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1542**: 149-159.
- Johnston C.I.** Angiotensin receptor antagonists: Focus on losartan. *The Lancet* 1995; **346**: 1403-1407.
- Jones P.M. und George A.M.** Symmetry and structure in P-glycoprotein and ABC transporters: What goes around comes around. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 5298-5305.
- Juel C.** Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol Rev* 1997; **77**: 321-358.
- Kanamitsu S.L., Ito K., Okuda H., Ogura K., Watabe T., Muro K. und Sugiyama Y.** Prediction of in vivo drug-drug interactions based on mechanisms-based inhibition from in vitro data: Inhibition of 5-fluorouracil metabolism by (E)-5-(2-Bromovinyl)uracil. *Drug Metab Dispos* 2000; **28**: 467-474.
- Kararli T.T.** Gastrointestinal absorption of drugs. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1989; **6**: 39-86.
- Karbach U., Kricke J., Meyer-Wentrup F., Gorboulev V., Volk C., Loffing-Cueni D., Kaisling B., Bachmann S. und Koepsell H.** Localization of the organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *Am J Physiol* 2000; **279**: F676-F687.
- Karlsson J., Kuo S.-M., Ziemniak J. und Artursson P.** Transport of celiprolol across human intestinal epithelial (Caco-2) cells: Mediation of secretion by multiple transporters including P-glycoprotein. *Br J Pharmacol* 1993; **110**: 1009-1016.
- Kartner N., Riordan J. R. und Ling V.** Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 1983; **221**: 1285-1288.
- Kazierad D.J., Martin D.E., Blum R.A., Tenero D.M., Ilson B., Boike S.C., Etheredge R. und Jorkasky D.K.** Effect of fluconazole on the pharmacokinetics of eprosartan and losartan in healthy male volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1997; **62**: 417-425.
- Kido Y., Tamai I., Okamoto M., Suzuki F. und Tsuji A.** Functional clarification of MCT1-mediated transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier using in vitro cultured cells and in vivo BUI studies. *Pharm Res* 2000; **17**: 55-62.
- Kim D.C., Harrison A.W., Ruwart M.J., Wilkinson K.F., Fisher J.F., Hidalgo I.J. und Borchardt R.T.** Evaluation of the bile acid transporter in enhancing intestinal permeability to renin-inhibitory peptides. *J Drug Target* 1993; **1**: 347-359.
- Kim S. und Iwao H.** Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 2000; **52**: 11-34.
- Koehler M.R., Gorboulev V., Koepsell H., Steinlein C. und Schmid M.** Roct1, a rat polyspecific transporter gene for the excretion of cationic drugs, maps to chromosome 1q11-12. *Mamm Genome* 1996; **7**: 247-248.
- Koggel A.** *Dissertation* Johannes Gutenberg-Universität Mainz; Mainz 2002.
- Kool M., de Haas M., Scheffer G.L., Scheper R.J., van Eijk M.J.T., Juijn J.A., Baas F. und Borst P.** Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1997; **57**: 3537-3547.
- Krishna R. und Mayer L.D.** Multidrug resistance (MDR) in cancer mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000; **11**: 265-283.
- Lande M.B., Priver N.A. und Zeidel M.L.** Determinants of apical membrane permeabilities of barrier epithelia. *Am J Physiol* 1994; **267**: 367-374.
- Leier I., Jedlitschky G., Buchholz U., Cole S.P.C., Deeley R.G. und Keppler D.** The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates. *J Biol Chem* 1994; **264**: 27807-27810.
- Leisen C., Dressler C., Herber B., Langguth P. und Spahn-Langguth H.** Lipophilicities of baclofen ester prodrugs correlate with affinities to the ATP-dependent efflux pump P-glycoprotein: Relevance for their penetration through the blood-brain barrier? *Pharm Res* 2002; eingereicht (1).
-

- Leisen C., Hanafy A. und Spahn-Langguth H.** Taurine and caffeine-containing energy drinks: Luminal presence of taurine reduces baclofen intestinal absorption in rats. *Pharm Res* 2002; eingereicht (2).
- Lennernäs H.** Does fluid flow across the intestinal mucosa affect quantitative oral drug absorption? Is it time for a reevaluation? *Pharm Res* 1995; **12**: 1573-1582.
- Leveque D. und Jehl F.** P-Glycoprotein and pharmacokinetics. *Anticancer Res* 1995; **15**: 331-336.
- Liang R., Fei Y.J., Prasad P.D., Ramamoorthy S., Han H., Yang-Feng T.L., Heidiger M.A. und Leibach F.H.** Human intestinal H⁺/peptide cotransporter: Cloning, functional characterization, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1995; **270**: 6456-6463.
- Lin C.J., Akarawut W. und Smith D.E.** Competitive inhibition of glycylsarcosine transport by enalapril in rabbit renal brush-border membrane vesicles: Interaction of ACE inhibitors with high-affinity H⁺/peptide symporter. *Pharm Res* 1999; **16**: 609-615.
- Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W. und Feeney P.J.** Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; **23**: 3-25.
- Lo M.W., Goldberg M.R., McCrea J.B., Lu H., Furtek C.I. und Bjornsson T.D.** Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP 3174 in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995; **58**: 641-649.
- Loe D.W., Deeley R.G. und Cole S.P.C.** Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. *Eur J Cancer* 1996; **32A**: 945-957.
- Lown K.S., Mayo R.R., Leichtman A.B., Hsiao H.-L., Turgeon D.K., Schmiedlin-Ren P., Brown M.B., Guo W., Rossi S.J., Benet L.Z. und Watkins P.B.** Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 1997; **62**: 248-260.
- Ma L., Krishnamachary N. und Center M.S.** Phosphorylation of the multidrug resistance-associated protein gene encoded protein P190. *Biochemistry* 1995; **34**: 3338-3343.
- MacKay J.H., Arcuri K.E. und Goldberg A.I.** Losartan and low-dose hydrochlorothiazide in patients with essential hypertension. *Arch Intern Med* 1996; **156**: 278-285.
- Madara J.L. und Trier J.S.** The functional morphology of the mucosa of the small intestine. In R. Johnson (ed.), *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3rd Edition, Raven Press, New York, 1994, Chapter 45.
- Makhey V.D., Guo A., Norris D.A., Hu P., Yan J. und Sinko P.J.** Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells. *Pharm Res* 1998; **15**: 1160-1166.
- Mallion J.-M., Bradstreet D.C. und Makris L.** Antihypertensive efficacy and tolerability of once daily losartan potassium compared with captopril in patients with mild to moderate essential hypertension. *J Hypertens* 1995; **13 Suppl. 1**: S35-S41.
- Marroum P., Spahn-Langguth H. und Langguth P.** Metabolism, transport and drug interactions. Chapter 9 in: Sahajwalla C. *New Drug Application: Regulatory and scientific principles for clinical pharmacology and biopharmaceutics*, 2002 (in Vorbereitung).
- Matsubara H.** Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res* 1998; **83**: 1182-1191.
- McCrea J.B., Lo M.W. und Furtek C.I.** Ketoconazole does not effect the systemic conversion of losartan to E-3174. *Clin Pharmacol Ther* 1996; **59**: 169.
- Meadowcroft A.M., Williamson K.M., Patterson J.H., Hinderliter A.L. und Pieper J.A.** The effects of fluvastatin, a CYP2C9 inhibitor, on losartan pharmacokinetics in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 1999; **39**: 418-424.
- Menz W.** AT₁-Rezeptorantagonisten: Vergleichende Darstellung einer neuen Arzneimittelklasse zur Therapie des Bluthochdruckes (1). *PZ Prisma* 1999; **6**: 35-41 (1).
- Menz W.** AT₁-Rezeptorantagonisten: Vergleichende Darstellung einer neuen Arzneimittelklasse zur Therapie des Bluthochdruckes (2). *PZ Prisma* 1999; **6**: 90-96 (2).
- Merck & Co., Inc.** Losartan potassium prescribing information. West Point, PA 19486, USA, April 1995.
- Meyer-Wentrup F., Karbach U., Gorboulev V., Arndt P. und Koepsell H.** Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **248**: 673-678.
- Moyle G.J. und Back D.** Principles and practice of HIV-protease inhibitor pharmacoenhancement. *HIV Med* 2001; **2**: 105-113.

- Munafò A., Christen Y., Nussberger J., Shum L.Y., Borland R.M., Lee R.J., Waeber B., Biollaz J. und Brunner H.R.** Drug concentration response relationships in normal volunteers after oral administration of losartan, an angiotensin II receptor antagonist. *Clin Pharmacol Ther* 1992; **51**: 513-521.
- Munk A.** log D-Werte, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazeutische Chemie, *Interner Report* 2001.
- Naasani I., Sugawara M., Kobayashi M., Iseki K. und Miyazaki K.** Transport mechanism of ceftibuten, a dianionic cephem, in rat renal brush-border membrane. *Pharm Res* 1995; **12**: 605-608.
- Neuhoff S., Langguth P., Dressler C., Andersson T.B., Regardh C.G. und Spahn-Langguth H.** Affinities at the verapamil binding site of MDR1-encoded P-glycoprotein: Drugs and analogs, stereoisomers and metabolites. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000; **38**: 168-179.
- Newman M.J., Rodarte J.C., Benbatoul K.D., Romano S.J., Zhang C., Moran E.J., Uyeda R.T., Dixon R., Guns E.S. und Mayer L.D.** Discovery and characterization of OC144-093, a novel inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Chancer Res* 2000; **60**: 2964-2972.
- Ohashi R., Tamai I., Yabuuchi H., Nezu J., Oku A. und Sai Y.** Na⁺-Dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): Its pharmacological and physiological relevance. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **291**: 778-784.
- Ohtawa M., Takayama F., Saitoh K., Yoshinaga T. und Nakashima M.** Pharmacokinetics and biochemical efficacy after single and multiple oral administration of losartan, an orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Br J Clin Pharmacol* 1993; **35**: 290-297.
- Okuno T., Sugiyama T., Tominaga M. Kojima S. und Ikeda T.** Effect of caffeine on microcirculation of human ocular fundus. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2001; **105**: 308-313.
- Oude Elferink R.P.J. und Jansen P.L.M.** The role of the canalicular multispecific organic anion transporter in the disposal of endo- and xenobiotics. *Pharmacol Ther* 1994; **64**: 77-97.
- Palm K., Luthman K., Ungell A.L., Strandlund G. und Artursson P.** Correlation of drug absorption with molecular surface properties. *J Pharm Sci* 1996; **85**: 32-39.
- Pauli-Magnus C., von Richter O., Burk O., Ziegler A., Mattang T., Eichelbaum M. und Fromm M.F.** Characterization of the major metabolites of verapamil as substrates and inhibitors of P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **293**: 376-382.
- Paulsen I.T und Skurray R.A.** The POT family of transport proteins. *TiBS* 1994; **19**: 404.
- Paulusma C.C., Bosma P.J., Zaman G.J., Bakker C.T.M., Otter M., Scheffer G.L., Scheper R.J., Borst P. und Oude Elferink R.P.J.** Congenital jaundice in rats with mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 1996; **271**: 1126-1128.
- Philp N., Chu P., Pan T.-C., Zhang R.Z., Chu M.L., Stark K., Boettinger D., Yoon H. und Kieber-Emmons T.** Developmental expression and molecular cloning of REMP, a novel retinal epithelial membrane protein. *Exp Cell Res* 1995; **219**: 64-73.
- Philp N.J., Yoon H. und Grollman E.F.** Monocarboxylate transporter MCT1 is isolated in the apical membrane and MCT3 in the basal membrane of the rat RPE. *Am J Physiol* 1998; **274**: R1824-R1828.
- Poole R.C. und Halestrap A.P.** Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 1993; **264**: C761-C782.
- Popovic V. und Popovic P.** Permanent cannulation of aorta and vena cava in rats and ground squirrel. *J Appl Physiol* 1960; **15**: 727-728.
- Raghavan K., Dwivedi A., Campbell Jr. G.C., Johnston E., Levorse D., McCauley J. und Hussain M.A.** Spectroscopic investigation of losartan polymorphs. *Pharm Res* 1993; **10**: 900-904.
- Raiden S., Giordano M., Andogengui G., Trevani A.S., Lopez D.H., Nahmod V. und Geffner J.R.** Losartan, a selective inhibitor of subtype AT₁ receptors for angiotensin II, inhibits the binding of N-formylmethionylleucylphenylalanine to neutrophil receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **281**: 624-628.
- Regev R., Assaraf Y.G. und Eytan G.D.** Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells. *Eur J Biochem* 1999; **259**: 18-24.
- Relling M.V., Pui C.H., Sandlund J.T., Rivera G.K., Hancock M.L., Boyett J.M., Schuetz E.G. und Evans W.E.** Adverse effect of anticonvulsants on efficacy of chemotherapy for acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2000; **356**: 285-290.
-

- Ribadeneira M.D., Aungst B.J., Eyermann C.J. und Huang S.-M.** Effects of structural modifications on the intestinal permeability of angiotensin II receptor antagonists and the correlation of in vitro, in situ and in vivo absorption. *Pharm Res* 1996; **13**: 227-233.
- Roch-Ramel F.** Effects of uricosuric and antiuricosuric agents on urate transport in human brush-border membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **280**: 839-845.
- Rubas W., Cromwell M.E.M., Shahrokh Z., Villagran J., Nguyen T.-N., Wellton M., Nguyen T.-H. und Mrsny R.J.** Flux measurement across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. *J Pharm Sci* 1996; **85**: 165-169.
- Sachinidis A.** EXP 3174, a metabolite of losartan (MK 954, DuP 753) is more potent than losartan in blocking the angiotensin II-induced responses in vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 1993; **11**: 155-162.
- Sachs L.** Angewandte Statistik. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1999.
- Saier M.H.** Computer-aided analyses of transport protein sequences: Gleaning evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiol Rev* 1994; **58**: 71-93.
- Saitoh H. und Aungst B.J.** Possible involvement of multiple P-glycoprotein-mediated efflux systems in the transport of verapamil and other organic cations across rat intestine. *Pharm Res* 1995; **12**: 1304-1310.
- Saitoh H., Motohashi H., Mukai M. und Inui K.** Cloning and characterization of a pH-sensing regulatory factor that modulates transport activity of the human H⁺/peptide cotransporter, PepT1. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **237**: 577-582.
- Saitoh H., Okuda M., Terada T., Sasaki S. und Inui K.** Cloning and characterization of a rat H⁺/peptide cotransporter mediating absorption of beta-lactam antibiotics in the intestine and kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; **275**: 1631-1637.
- Saitoh S., Gerard C. und Aungst B.J.** The secretory intestinal transport of some beta-lactam antibiotics and anionic compounds: A mechanism contributing to poor oral absorption. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; **278**: 205-211.
- Sakai M., Noach A.B., Blom-Rosemalen M.C., de-Boer A.G. und Breimer D.D.** Absorption enhancement of hydrophilic compounds by verapamil in Caco-2 cell monolayers. *Biochem Pharmacol* 1994; **48**: 1199-1210.
- Sandwall P., Lo M.W., Jonzon B., Dalen P., Furtek C., Ritter M., Alvan G., McCrea J. und Sjöqvist F.** Lack of polymorphism of the conversion of losartan to its active metabolite E-3174 in extensive and poor metabolizers of debrisoquine (cytochrome P450 2D6) and mephenytoin (cytochrom P4502C19). *Eur J Clin Pharmacol* 1999; **55**: 279-283.
- Sasaki M., Fujimura A., Harada K., Sunaga K.-I. und Ebihara A.** Clinical pharmacology of multiple dose losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in patients with essential hypertension. *J Clin Pharmacol* 1996; **36**: 403-408.
- Schambye H.T., Hjorth S.A., Bergsma D.J., Sathe G. und Schwartz T.W.** Differentiation between binding sites for angiotensin II and nonpeptide antagonists on the angiotensin II type 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 7046-7050 (1).
- Schambye H.T., von Wijk B., Hjorth S.-A., Wiene W., Entzeroth M., Bergsma D.J. und Schwartz T.W.** Mutations in transmembrane segment VII of the AT₁ receptor differentiate between closely related insurmountable and competitive angiotensin antagonists. *Br J Pharmacol* 1994; **113**: 331-333 (2).
- Schoolar Reynolds K.** Decision points for requiring an in vivo study. 7th EUFEPS Conference on optimizing drug development: Strategies to assess drug metabolism/transport interaction potential - Towards a Consensus. Basel 2000.
- Schuetz E.G., Beck W.T. und Schuetz J.D.** Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 1996; **49**: 311-318.
- Schuetz E.G. und Strom S.** Promiscuous regulator of xenobiotic removal. *Nat Med* 2001; **7**: 536-537.
- Schwarz U.I., Gramatte T., Krappweis J., Oertel R. und Kirch W.** P-Glycoprotein inhibitor erythromycin increases oral bioavailability of talinolol in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000; **38**: 161-167.
- Schweifer N. und Barlow D.P.** The *Lx1* gene maps to mouse chromosome 17 and codes for a protein that is homologous to glucose and polyspecific transmembrane transporters. *Mamm Genome* 1996; **7**: 735-740.
- Seelig A.** How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998; **36**: 50-54.

- Shah V.P., Midha K.K., Dighe S., McGilveray I.J., Skelly J.P., Yacobi A., Layloff T., Viswanathan C.T., Cook C.E., McDowall R.D., Pittman K.A. und Spector S.** Analytical method validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci* 1992; **81**: 309-314.
- Shah V.P., Midha K.K., Findlay J.W., Hill H.M., Hulse J.D., McGilveray I.J., McKay G., Miller K.J., Patnaik R.N., Powell M.L., Tonelli A., Viswanathan C.T. und Yacobi A.** Bioanalytical method validation: A revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 2000; **17**: 1551-1557.
- Shapiro A.B. und Ling V.** ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1994; **269**: 3745-3754.
- Shapiro A.B. und Ling V.** Reconstitution of drug transport by purified P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1995; **270**: 16167-16175.
- Sica D.A., Lo M.W. und Shaw W.C.** The pharmacokinetics of losartan in renal insufficiency. *J Hypertens* 1995; **13 Suppl. 1**: S49-S52.
- Simons K. und Fuller S.D.** Cell surface polarity in epithelia. *Ann Rev Cell Biol* 1985; **1**: 243-288.
- Sinko P.J., Leesman G.D. und Amidon G.L.** Predicting fraction dose absorbed in humans using a macroscopic mass balance approach. *Pharm Res* 1991; **8**: 979-988.
- Soldner A.** In vitro and in vivo characterization of the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the angiotensin II antagonist losartan and its congeners. *Shaker Verlag GmbH Aachen* 1996 (1).
- Soldner A., Benet L.Z., Mutschler E. und Christians U.** Active transport of the angiotensin II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR 1 and Caco-2 cell monolayers. *Br J Pharmacol* 2000; **129**: 1235-1243.
- Soldner A., Christians U., Susanto M., Wacher V.J., Silverman J.A. und Benet L.Z.** Grapefruit juice activates P-glycoprotein-mediated drug transport. *Pharm Res* 1999; **16**: 478-485.
- Soldner A., Spahn-Langguth H. und Mutschler E.** The renin angiotensin aldosterone system: Focus on its distinct role in arterial hypertension and its various inhibitors as a therapeutic strategy to effectively lower blood pressure. *Die Pharmazie* 1996; **51**: 783-799 (2).
- Spahn-Langguth H., Baktir G., Radschuweit A., Okyar A., Terhaag B., Ader P., Hanafy A. und Langguth P.** P-Glycoprotein transporters and the gastrointestinal tract: Evaluation of the potential in vivo relevance of in vitro data employing talinolol as model compound. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998; **36**: 16-24.
- Stearns R.A., Chakravarty P.K., Chen R. und Chiu S.-H.L.** Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes: Role of cytochrome P 4502C and 3A subfamily members. *Drug Metab Dispos* 1995; **23**: 207-215.
- Stearns R.A., Miller R.R., Doss G.A., Chakravarty P.K., Rosegay A., Gatto G.J. und Chiu S.-H.L.** The metabolism of DuP 753, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, by rat, monkey and human liver slices. *Drug Metab Dispos* 1992; **20**: 281-287.
- Steiner H.-Y., Naider F. und Becker J.M.** The PTR-family: A new group of peptide transporters. *Mol Microbiol* 1995; **16**: 825-834.
- Suzuki H. und Sugiyama Y.** Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. *Sem Liver Dis* 1998; **18**: 359-376.
- Suzuki H. und Sugiyama Y.** Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *Eur J Pharm Sci* 2000; **12**: 3-12.
- Synold T.W., Dussault I. und Forman B.M.** The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med* 2001; **7**: 584-590.
- Swaan P.** Recent advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor-mediated transport pathways. *Pharm Res* 1998; **15**: 826-834.
- Takahashi K., Nakamura N., Terada T., Okano T., Futami T., Saito H. und Inui K.I.** Interaction of beta-lactam antibiotics with H⁺/peptide cotransporters in rat renal brush-border membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **286**: 1037-1042.
- Takanaga H., Tamai I. und Tsuji A.** pH-Dependent and carrier-mediated transport of salicylic acid across Caco-2 cells. *J Pharm Pharmacol* 1994; **46**: 567-570.
- Tamai I., Nakanishi T., Hayashi K., Terao T., Sai Y., Shirage T., Miyamoto K., Takeda E., Higashida H. und Tsuji A.** The predominant contribution of oligopeptide transporter PepT1 to intestinal absorption of beta-lactam antibiotics in the small intestine. *J Pharm Pharmacol* 1997; **49**: 796-801.
-

- Tamai I., Ohashi R., Nezu J., Yabuuchi H., Oku A. und Shimane M.** Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem* 1998; **273**: 20378-20382.
- Tamai I., Sai Y., Ono A., Kido Y., Yabuuchi H., Takanaga H., Satoh E., Ogihara T., Amano O., Izeki S. und Tsuji A.** Immunohistochemical and functional characterization of pH-dependent intestinal absorption of weak organic acids by the monocarboxylic acid transporter MCT1. *J Pharm Pharmacol* 1999; **51**: 1113-1121.
- Tamai I. und Tsuji A.** Carrier-mediated approaches for oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1996; **20**: 5-32.
- Tanaka H., Meyamoto K.-I., Morita H., Segawa H., Shiraga T., Fujioka A., Kouda T., Taketani Y., Hisano S., Fukui Y., Kitagawa K. und Takeda E.** Regulation of the PepT1 peptide transporter in the rat small intestine in response to 5-fluorouracil-induced injury. *Gastroenterol* 1998; **114**: 714-723.
- Temple C.S., Bronk J.R., Bailey P.D. und Boyd C.A.R.** Substrate-charge dependence of stoichiometry shows membrane potential is the driving force for proton-peptide cotransport in rat renal cortex. *Pfluegers Arch* 1995; **430**: 825-829.
- Terada T., Saito H., Mukai M. und Inui K.** Recognition of beta-lactam antibiotics by rat peptide transporters, PepT1 and PepT2, in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 1997; **273**: F706-F711.
- Terada T., Sawada K., Saito H., Hashimoto Y. und Inui K.** Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am J Physiol* 1999; **276**: G1435-G1441.
- Terashita S., Dresser M.J., Zhang L., Gray A.T., Yost S.C. und Giacomini K.M.** Molecular cloning and functional expression of a rabbit renal organic cation transporter. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1369**: 1-6.
- Thiebaut F., Tsuru T., Hamada H., Gottesman M.M., Pastan I. und Willingham M.C.** Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: Evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* 1989; **37**: 159-164.
- Thwaites D.T., Armstrong G., Hirst B.H. und Simons N.L.** D-Cycloserin transport in human intestinal (Caco-2) cells: Mediation by a H⁺-coupled amino acid transporter. *Br J Pharmacol* 1995; **115**: 761-766.
- Timmermanns P.B.M.W.M. und Ikram H.** 17th Congress of the European Society of Cardiology, Satellitensymposium „The rationale for angiotensin II antagonists in cardiac disease“, Amsterdam 22. August 1995.
- Timmermanns P.B.M.W.M., Wong P.C., Chiu A.T., Herblin W.F., Benfield P., Carini D.J., Lee R.J., Wexler R.R., Saye J.A.M. und Smith R.D.** Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; **45**: 205-245.
- Tsuji A., Takanaga H., Tamai I. und Terasaki T.** Transcellular transport of benzoic acid across Caco-2 cells by pH-dependent and carrier-mediated transport mechanism. *Pharm Res* 1994; **11**: 30-37.
- Tsuji A. und Tamai I.** Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharm Res* 1996; **13**: 963-977.
- Tsunoda S.M., Harris R.Z., Christians U., Velez R.L., Freeman R.B., Benet L.Z. und Warshaw A.** Red wine decreases cyclosporine bioavailability. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **70**: 462-467.
- Ungell A.L.** In vitro absorption studies and their relevance to absorption from GI tract. *Drug Dev Ind Pharm* 1997; **23**: 879-892.
- Utkovic H.** Development of the double perfusion technique for the rat jejunum. *Göteborg University, College of Health and Caring Science, Department of Medical Laboratory Science* 1999.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. und Li P.W.** The sequence of the human genome. *Science* 2001; **291**: 1304-1351.
- Versantvoort C.H.M., Broxterman H.J., Bagrij T., Scheper R.J. und Twentyman P.R.** Regulation by glutathione of drug transport in multidrug resistant human lung cell lines overexpressing multidrug resistance-associated protein. *Br J Cancer* 1995; **72**: 82-89.
- Vore M.** Phase III elimination: Another two-edged sword. *Environ Health Perspect* 1994; **102**: 422-423.
- Vries M.H., Redegeld F.A., Koster A.S., Noordhoek J., Haan J.G. und Oude Elferink R.P.J.** Hepatic, intestinal and renal transport of 1-naphthol-beta-D-glucuronide in mutant rats with hereditary-conjugated hyperbilirubinemia. *Nauyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989; **340**: 588-592.
- Wacher V.J., Wu C.-Y. und Benet L.Z.** Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P 4503A and P-glycoprotein: Implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog* 1995; **13**: 129-134.

- Wagner D., Spahn-Langguth H., Hanafy A., Koggel A. und Langguth P.** Intestinal drug efflux: Formulation and food effects. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; **50 Suppl. 1**: S13-S31.
- Walker D., Thwaites D.T., Simmons N.L., Gilbert H.J. und Hirst B.H.** Substrate upregulation of the human small intestinal peptide transporter, hPepT1. *J Physiol* 1998; **507**: 697-706.
- Weber M.A., Bynny R.L. und Pratt J.H.** Blood pressure effects of the angiotensin II receptor blocker losartan. *Arch Intern Med* 1995; **155**: 405-411.
- Wenzel U., Diehl D., Hergert M. und Daniel H.** Endogenous expression of the renal high-affinity H⁺-peptide cotransporter in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 1998; **275**: C1573-C1579.
- Wenzel U., Gebert I., Weintraut H., Weber W.-M., Clauss W. und Daniel H.** Transport characteristics of differently charged cephalosporin antibiotics in oocytes expressing the cloned intestinal peptide transporter PepT1 and in human intestinal Caco-2 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; **277**: 831-839.
- Whitebread S., Mele M., Kamber B. und de Gasparo M.** Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **163**: 284-291.
- Williamson K.M., Patterson J.H., McQueen R.H., Adams K.F. und Pieper J.A.** Effects of erythromycin or rifampicin on losartan pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1998; **63**: 316-323.
- Winiwarter S., Bonham N.M., Ax F., Hallberg A., Lennernäs H. und Karlen A.** Correlation of human jejunal permeability (in vivo) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters: A multivariate data analysis approach. *J Med Chem* 1998; **41**: 4939-4949.
- Wong P.C., Price W.A. und Chiu A.T.** Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: Studies with EXP 9270 and DuP 753. *Hypertension* 1990; **15**: 823-834 (4).
- Wong P.C., Price W.A. und Chiu A.T.** In vivo pharmacology of DuP 753. *Am J Hypertens* 1991; **4 Suppl. 2**: 288S-298S.
- Wong P.C., Price W.A., Chiu A.T., Duncia J.V., Carini D.J., Wexler R.R., Johnson A.L. und Timmermans P.B.M.W.M.** Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VIII. Characterization of functional antagonism displayed by DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; **252**: 719-725 (1).
- Wong P.C., Price W.A., Chiu A.T., Duncia J.V., Carini D.J., Wexler R.R., Johnson A.L. und Timmermans P.B.M.W.M.** Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. IX. Antihypertensive activity in rats of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; **252**: 726-732 (2).
- Wong P.C., Price W.A., Chiu A.T., Duncia J.V., Carini D.J., Wexler R.R., Johnson A.L. und Timmermans P.B.M.W.M.** Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP 3174: an active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; **255**: 211-217 (3).
- Wu C.Y., Benet L.Z., Hebert M.F., Gupta S.K., Rowland M., Gomez D.Y. und Wacher V.J.** Differentiation of absorption and first-pass gut and hepatic metabolism in humans: Studies with cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 1995; **58**: 492-497.
- Wu L.-S., Gerard C. und Hussain M.A.** Thermal analysis and solution calorimetry studies on losartan polymorphs. *Pharm Res* 1993; **10**: 1793-1795.
- Wu X., Huang W., Prasad P.D., Seth P., Rajan D.P. und Leibach F.H.** Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **290**: 1482-1492.
- Yamada T., Horiuchi M. und Dzau V.J.** Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Acad Sci USA* 1996; **93**: 156-160.
- Yamashita S., Furubayashi T., Kataoka M., Sakane T., Sezaki H. und Touda H.** Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 2000; **10**: 195-204.
- Yang J.J., Kim K.-J. und Lee V.H.L.** Role of P-glycoprotein in restricting propranolol transport in cultured rabbit conjunctival epithelial cell layers. *Pharm Res* 2000; **17**: 533-538.
- Yasar Ü., Tybring G., Hidestrand M., Oscarson M., Ingelman-Sundberg M., Dahl M.-L. und Eliasson E.** Role of CYP2C9 polymorphism in losartan oxidation. *Drug Metab Dispos* 2001; **29**: 1051-1056.
- Yoon H.Y., Fanelli A., Grollman E.F. und Philp N.J.** Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **234**: 90-94.
- Yuasa H., Iga T., Hanano M. und Watanabe J.** Comparative assessment of the resistance of the unstirred water layer to solute transport between two different intestinal perfusion systems. *Biochim Biophys Acta* 1988; **938**: 189-198.

-
- Yun C.-H., Lee H.S., Lee H., Rho J.K., Jeong H.G. und Guengerich F.P.** Oxidation of the angiotensin II receptor antagonist losartan (DuP 753) in human liver microsomes: Role of cytochrome P4503A4 in formation of the active metabolite EXP 3174. *Drug Metab Dispos* 1995; **23**: 285-289.
- Zeller R. und zur Hausen W.J.** Onkologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklungen. *Ecomed Verlagsgesellschaft Landsberg/Lech* 1998.
- Zhang L., Dresser M.J., Gray A.T., Yost S.C., Terashita S. und Giacomini K.M.** Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter (hOCT1). *Mol Pharm* 1997; **51**: 913-921.
- Zhang Y. und Benet L.Z.** The gut as a barrier to drug absorption: Combined role of cytochrome P4503A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* 2001; **40**: 159-168.
-

-Anhang-

A. Rohdaten der In-vitro-Studien mit Caco-2-Zellen

A.1. Bindungsstudien

A.1.A. Allgemeine Untersuchungen

A.1.A.I.a-d Untersuchungen zu Lösungsmiteleinflüssen ohne Zusatz eines RL-Bindungsinhibitors

A.1.A.I.a. Bindungsdaten (Radioaktivität [DPM/Filter]) verschiedener Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, Acetonitril und DMSO) in unterschiedlichen Konzentrationen durch Verdrängung des Radioliganden ³H-Talinolol (1 µM Talinolol mit 20% ³H-Talinolol)

Lösungsmittel	Konzentration im Well [% in HBSS-Puffer]			
	20	2	0,2	0,02
Methanol				
Count 1 [DPM/Filter]	5068,31	10501,88	10997,04	12322,96
Count 2 [DPM/Filter]	5247,77	10826,84	11188,61	12523,09
<i>MW</i>	5158,04	10664,36	11092,83	12423,03
<i>SEM</i>	89,73	162,48	95,78	100,07
Ethanol				
Count 1 [DPM/Filter]	4117,39	7942,39	9871,15	9646,03
Count 2 [DPM/Filter]	4314,40	8175,96	10190,90	10019,12
<i>MW</i>	4215,90	8059,18	100031,03	9832,58
<i>SEM</i>	98,50	116,78	159,88	186,55
Acetonitril				
Count 1 [DPM/Filter]	1723,45	9984,49	11151,41	9633,24
Count 2 [DPM/Filter]	1960,56	10244,41	11190,37	9512,88
<i>MW</i>	1842,01	10114,45	11170,89	9573,06
<i>SEM</i>	118,55	129,96	19,48	60,18
DMSO				
Count 1 [DPM/Filter]	4154,92	10856,14	12172,69	11278,59
Count 2 [DPM/Filter]	4194,64	11045,92	12355,56	11435,89
<i>MW</i>	4174,78	10951,03	12264,13	11357,24
<i>SEM</i>	19,86	94,89	91,44	78,65

A.1.A.I.b. Bindungsdaten (Radioaktivität [DPM/Filter]) von Acetonitril durch Verdrängung des Radioliganden ^3H -Talinolol (1 μM Talinolol mit 20% ^3H -Talinolol)

Konzentration im Well [% in HBSS-Puffer]	Radioaktivität [DPM/Filter]			
	Count 1	Count 2	MW	SEM
20	1723,45	1960,56	1842,01	118,55
10	4234,36	4350,79	4292,58	58,21
5	5732,55	6051,94	5892,25	159,69
3,6	6315,95	6603,29	6459,62	143,67
2,5	9530,29	9784,15	9657,22	126,93
1,6	9984,49	10244,41	10114,45	129,96
0,8	5632,42	5801,75	5717,09	84,67
0,4	10190,79	10600,44	10395,62	204,82
0,2	11151,41	11190,37	11170,89	19,48
0,1	9530,27	9510,19	9520,23	10,04
0,01	9633,24	9512,88	9573,06	60,18
0	8147,27	8379,12	8263,20	115,93

A.1.A.I.c. Bindungsdaten (Radioaktivität [DPM/Filter]) von Ethanol durch Verdrängung des Radioliganden ^3H -Talinolol (1 μM Talinolol mit 20% ^3H -Talinolol)

Konzentration im Well [% in HBSS-Puffer]	Radioaktivität [DPM/Filter]			
	Count 1	Count 2	MW	SEM
20	3561,77	3670,26	3616,02	54,24
10	5252,43	5236,66	5244,55	7,89
5	7003,71	7216,55	7110,13	106,42
3,6	7789,79	7941,58	7865,99	75,90
2,5	8383,79	8417,33	8400,56	16,77
1,6	9469,82	9614,22	9542,02	72,20
0,8	10493,08	10206,87	10349,98	143,10
0,4	9927,49	10159,43	10043,46	115,97
0,2	10216,92	10080,07	10148,50	68,43
0,1	10810,01	10747,47	10778,74	31,27
0,01	9630,49	9752,19	9691,34	60,85
0	10404,44	10536,79	10470,62	66,17

A.1.A.I.d. Bindungsdaten (Radioaktivität [DPM/Filter]) von DMSO durch Verdrängung des Radioliganden ³H-Talinolol (1 µM Talinolol mit 20% ³H-Talinolol)

Konzentration im Well [% in HBSS-Puffer]	Radioaktivität [DPM/Filter]			
	Count 1	Count 2	MW	SEM
20	4789,03	5014,05	4901,54	112,51
10	7703,95	7596,05	7620,00	53,95
5	10393,47	10232,79	10313,13	80,34
3,6	10337,99	10459,35	10398,67	60,68
2,5	10391,95	10389,74	10390,85	1,10
1,6	12734,13	12616,23	12675,18	58,95
0,8	14478,74	14389,73	14434,24	44,50
0,4	14118,77	14054,68	14086,73	32,05
0,2	14163,34	15493,14	15328,24	164,90
0,1	14083,70	14227,61	14155,66	71,96
0,01	12370,87	12086,84	12228,86	142,02
0	11734,71	12010,30	11872,51	137,80

A.1.A.I.e-f Lösungsmiteleinflüsse bei Zusatz eines RL-Bindungsinhibitors

A.1.A.I.e. Talinolol-Bindungsdaten (Radioaktivität [DPM/Filter]): Einfluss des Lösungsmittelgehaltes (Methanol, Ethanol und Acetonitril) in der Probe auf die unter Zusatz von Talinolol (4 mM) als RL-Bindungsinhibitor beobachtete Verdrängung des Radioliganden ³H-Talinolol (1 µM Talinolol mit 20% ³H-Talinolol)

Lösungsmittel	Konzentration im Well [µM] und (% Lösungsmittel)			
	4000 (20 %)	400 (2 %)	40 (0,2 %)	4 (0,02 %)
Talinolol in HBSS pH 7,0				
Count 1 [DPM/Filter]	8896,95	18451,16	21420,50	24003,36
Count 2 [DPM/Filter]	8962,09	18323,83	21121,53	23848,33
MW	8929,52	18387,50	21271,02	23925,85
SEM	32,57	63,66	149,48	77,52
Talinolol in HBSS/Methanol				
Count 1 [DPM/Filter]	3650,43	7127,14	8538,04	8910,21
Count 2 [DPM/Filter]	3643,25	7159,07	8750,13	9278,76
MW	3646,84	7143,11	8644,09	9094,49
SEM	3,59	15,97	106,05	184,27
Talinolol in HBSS/Ethanol				
Count 1 [DPM/Filter]	3779,19	4654,52	5254,37	4361,10
Count 2 [DPM/Filter]	3986,40	4705,86	5344,49	4431,40
MW	3882,80	4680,19	5299,43	4396,25
SEM	103,60	25,67	45,06	35,15
Talinolol in HBSS/DMSO				
Count 1 [DPM/Filter]	2533,34	6444,59	9595,12	11446,56
Count 2 [DPM/Filter]	2541,45	6599,66	9475,67	11725,69
MW	2537,40	6522,13	9535,40	11586,13
SEM	4,05	77,53	59,72	139,57

A.1.A.I.f. Talinolol-Bindungsdaten (Radioaktivität [DPM/Filter]): Einfluss des Ethanolgehaltes in der Probe auf die unter Zusatz von Talinolol (4 mM) als RL-Bindungsinhibitor beobachtete Verdrängung des Radioliganden ^3H -Talinolol (1 μM Talinolol mit 20% ^3H -Talinolol)

Konzentration im Well [μM]	Talinolol in HBSS pH 7,0				Talinolol in HBSS/Ethanol pH 7,0			
	Radioaktivität [DPM/Filter]							
	Count 1	Count 2	MW	SEM	Count 1	Count 2	MW	SEM
4000	8896,95	8962,09	8929,52	32,57	2665,93	2641,59	2653,76	12,17
2000	11005,33	10992,89	10999,11	6,22	4225,42	4158,76	4192,09	33,33
1000	14711,92	14457,94	14584,93	126,99	5070,24	5103,61	5086,93	16,69
720	18451,16	18323,83	18387,50	63,66	5417,50	5457,88	5437,69	20,19
500	21420,50	21121,53	21271,02	149,48	6152,52	5985,47	6069,00	83,52
320	24323,81	23940,10	24131,96	191,85	5912,52	6048,54	5980,53	68,01
160	24003,36	23848,33	23925,85	77,52	7616,52	7565,87	7591,20	25,33
80	24891,72	25039,65	24965,69	73,96	7967,42	7980,00	7973,71	6,29
40	23398,01	23675,47	23536,74	138,73	9184,59	9222,09	9203,34	18,75
20	25742,23	25471,97	25607,10	135,13	8652,64	9135,52	8894,08	241,44
2	25170,76	25207,21	25188,99	18,22	7767,26	7869,03	7818,15	50,88
0	23631,08	23301,29	23466,19	164,89	9009,17	9239,91	9124,54	115,37

A.1.A.II. Einfluss des pH-Wertes auf die Verdrängung von ^3H -Talinolol

A.1.A.II.a. Affinität des Radioliganden ^3H -Talinolol (1 μM Talinolol mit 20% ^3H -Talinolol) bei verschiedenen Puffer-pH-Werten (pH-Varianten zur Verbesserung der Löslichkeit von basischen Substanzen)

	Radioaktivität [DPM/Filter]				
	Well 1	Well 2	Well 3	MW	SEM
HBSS pH 5,5					
Count 1 [DPM/Filter]	13714,80	13675,15	14800,39	14063,45	368,65
Count 2 [DPM/Filter]	14015,35	13903,54	14934,82	14284,57	326,72
MW Gesamt	14174,01				
SEM Gesamt	110,56				
HBSS pH 6,0					
Count 1 [DPM/Filter]	14549,46	13795,38	14827,04	14390,63	308,22
Count 2 [DPM/Filter]	15009,15	13938,27	14930,69	14626,04	344,63
MW Gesamt	14508,33				
SEM Gesamt	117,71				
HBSS pH 6,5					
Count 1 [DPM/Filter]	15755,36	14766,56	15320,19	15280,70	286,12
Count 2 [DPM/Filter]	15843,52	15017,20	15967,04	15609,25	298,17
MW Gesamt	15444,98				
SEM Gesamt	164,28				
HBSS pH 7,0					
Count 1 [DPM/Filter]	19713,41	19211,21	17498,18	18807,60	670,57
Count 2 [DPM/Filter]	19293,89	19189,14	17625,95	18702,99	539,37
MW Gesamt	18755,30				
SEM Gesamt	52,30				

A.1.A.II.b. Talinolol-Bindungsdaten (Radioaktivität [DPM/Filter]) für 4000 µM Talinolol im pH-Bereich 2,0-7,0

pH-Wert im Well	Radioaktivität [DPM/Filter]			
	Count 1	Count 2	MW	SEM
2,0	5735,68	5878,19	5806,94	71,26
2,5	6078,65	6170,82	6124,74	46,09
3,2	4736,96	4854,17	4795,57	58,60
3,5	5635,57	5639,41	5637,49	1,92
4,2	5597,20	5558,12	5577,66	19,54
4,7	4849,68	4886,37	4868,03	18,35
4,9	4945,34	5027,61	4986,48	41,13
5,5	5566,06	5611,75	5588,91	22,84
6,0	5381,19	5356,85	5369,02	12,17
7,0	-	-	-	-
HBSS pH 7,0	13282,89	13150,70	13216,80	103,96

A.1.B. Testung verschiedener Substanzen

A.1.B.I. Bestimmung von Substanzen mit P-GP-Affinität

A.1.B.I.a. Verapamil-Bindungsdaten (Radioaktivität [DPM/Filter]) durch Verdrängung des Radioliganden ³H-Talinolol (Radioligand 1: 1 µM Talinolol mit 20% ³H-Talinolol; Radioligand 2: 5 µM Talinolol mit 4% ³H-Talinolol und Radioligand 3: 0,2 µM Talinolol mit 100% ³H-Talinolol)

Konzentration im Well [µM]	Radioaktivität [DPM/Filter]			
	Count 1	Count 2	MW	SEM
Radioligand 1 (1 µM Talinolol mit 20% ³H-Talinolol)				
5000	5799,99	5844,74	5822,36	22,37
1000	11216,19	11356,41	11286,30	70,11
200	16273,37	16334,08	16303,72	30,35
40	22072,01	22262,37	22167,19	95,18
8	25233,67	25355,74	25294,71	61,04
1,6	26877,12	27001,89	26939,50	62,39
0,16	25498,13	25794,14	25646,14	148,00
0	26741,87	26990,17	26866,02	124,15
Radioligand 2 (5 µM Talinolol mit 4% ³H-Talinolol)				
5000	5365,46	5456,52	5410,99	45,53
200	15587,24	15674,61	15630,93	43,69
8	23064,04	23285,54	23174,79	110,75
0	25282,46	25648,86	25465,66	183,20
Radioligand 3 (0,2 µM Talinolol mit 100% ³H-Talinolol)				
5000	5839,82	5945,24	5892,53	52,71
200	18054,46	18237,32	18145,89	91,43
8	26501,53	26619,14	26560,34	58,81
0	28536,53	28694,82	28615,67	79,15

A.1.B.I.b. Alprenolol-Bindungsdaten (Radioaktivität [DPM/Filter]) durch Verdrängung des Radioliganden ³H-Talinolol (Radioligand 1: 1 µM Talinolol mit 20% ³H-Talinolol; Radioligand 2: 5 µM Talinolol mit 4% ³H-Talinolol und Radioligand 3: 0,2 µM Talinolol mit 100% ³H-Talinolol)

Konzentration im Well [µM]	Radioaktivität [DPM/Filter]			
	Count 1	Count 2	MW	SEM
Radioligand 1 (1 µM Talinolol mit 20% ³H-Talinolol)				
30000	4602,16	4712,16	4657,16	55,00
6000	8184,21	8269,12	8226,66	42,46
1200	11391,21	13738,39	12564,80	1173,59
240	17759,19	17951,29	17855,24	96,05
48	21478,24	21579,98	21529,11	50,87
9,6	24342,85	24621,51	24482,18	139,33
0,96	22494,54	22778,14	22636,34	141,80
0	23840,74	24161,24	24000,99	160,25
Radioligand 2 (5 µM Talinolol mit 4% ³H-Talinolol)				
30000	4930,08	5021,08	4975,58	45,50
1200	13273,53	13386,07	13329,80	56,27
48	19713,88	19837,69	19775,79	61,90
0	23507,34	23623,73	23565,74	58,20
Radioligand 3 (0,2 µM Talinolol mit 100% ³H-Talinolol)				
30000	4008,54	4033,99	4021,26	12,72
1200	13029,34	13048,69	13039,01	9,68
48	23544,74	23784,66	23664,70	119,96
0	28473,64	28763,30	28618,47	144,83

A.1.B.I.c. Talinolol-Bindungsdaten (Radioaktivität [DPM/Filter]) durch Verdrängung des Radioliganden ³H-Talinolol (Radioligand 1: 1 µM Talinolol mit 20% ³H-Talinolol; Radioligand 2: 5 µM Talinolol mit 4% ³H-Talinolol und Radioligand 3: 0,2 µM Talinolol mit 100% ³H-Talinolol)

Konzentration im Well [µM]	Radioaktivität [DPM/Filter]			
	Count 1	Count 2	MW	SEM
Radioligand 1 (1 µM Talinolol mit 20% ³H-Talinolol)				
2500	12880,76	12940,30	12910,53	29,77
500	15282,92	15277,89	15280,41	2,52
100	17993,38	18033,99	18013,69	20,30
20	20999,14	21150,36	21074,75	75,61
4	17560,42	17620,47	17590,45	30,20
0,8	19160,59	19106,32	19133,46	27,13
0,08	21977,92	22036,19	22007,06	29,14
0	24118,69	22875,22	23496,96	621,73
Radioligand 2 (5 µM Talinolol mit 4% ³H-Talinolol)				
2500	12811,29	12831,86	12821,58	10,29
100	20911,98	20965,83	20938,90	26,93
4	24633,47	24925,10	24779,29	145,82
0	24948,50	25182,89	25065,70	117,19

Konzentration im Well [μM]	Radioaktivität [DPM/Filter]			
	Count 1	Count 2	MW	SEM
Radioligand 3 (0,2 μM Talinolol mit 100% ^3H-Talinolol)				
5000	12377,82	12462,15	12419,99	42,16
200	17393,29	17628,61	17510,95	117,66
80	24552,95	24772,06	24662,51	109,56
0	27220,14	27110,02	27165,08	55,06

A.1.B.II. Bestimmung von Losartan und EXP 3174

A.1.B.II.a. Losartan-Bindungsdaten (Radioaktivität [DPM/Filter]) durch Verdrängung des Radioliganden ^3H -Talinolol (1 μM Talinolol mit 20% ^3H -Talinolol)

Konzentration im Well [μM]	Radioaktivität [DPM/Filter]					
	Well 1		Well 2		MW	SEM
	Count 1	Count 2	Count 1	Count 2		
Totale Bindung [DPM]						
4000	2883,92	3058,04	2401,94	2395,82	2684,93	168,94
2666,67	3201,10	3263,25	2557,02	2770,67	2948,01	170,23
1333,35	3627,75	3874,35	3475,27	3582,47	3639,96	84,42
666,68	4038,83	4287,58	4000,02	4166,62	4123,26	65,32
222,23	4896,20	5170,73	4480,73	4684,41	4808,02	147,69
78,08	4747,97	4720,61	4313,33	4446,81	4557,18	105,97
24,69	4598,18	4605,31	4356,76	4279,45	4459,93	83,40
8,23	4534,04	4745,07	4727,95	4696,55	4675,90	48,34
2,74	4498,30	4351,75	4173,39	4439,11	4365,64	70,80
0,91	4295,01	4297,45	4057,19	4143,80	4198,36	59,21
0,09	4152,90	4197,79	3999,05	3973,84	4080,90	55,53
0	3883,66	3952,82	3845,29	3916,29	3902,02	23,67
Spezifische Bindung [%]						
4000	74,26	77,36	62,46	61,02	68,78	4,12
2666,67	82,42	82,55	66,50	70,57	75,51	4,11
1333,35	93,41	98,01	90,38	91,24	93,26	1,71
666,68	104,00	108,47	104,02	106,12	105,65	1,06
222,23	126,07	130,81	116,53	119,31	123,18	3,24
78,08	122,26	119,42	112,17	113,26	116,78	2,43
24,69	118,40	116,51	113,30	108,99	114,30	2,06
8,23	116,75	120,04	122,95	119,62	119,84	1,27
2,74	115,83	110,09	108,53	113,06	111,88	1,62
0,91	110,59	108,72	105,51	105,54	107,59	1,25
0,09	106,93	106,20	104,00	101,21	104,58	1,29
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0

A.1.B.II.b. EXP 3174-Bindungsdaten (Radioaktivität [DPM/Filter]) durch Verdrängung des Radioliganden ³H-Talinolol (1 µM Talinolol mit 20% ³H-Talinolol)

Konzentration im Well [µM]	Radioaktivität [DPM/Filter]					
	Well 1		Well 1		MW	SEM
	Count 1	Count 2	Count 1	Count 2		
Totale Bindung [DPM]						
4000	1849,36	1870,83	1978,14	1950,44	1912,19	30,92
2666,67	2513,28	2549,28	2511,59	2664,09	2559,56	35,91
1333,35	3338,07	3276,27	4067,62	4172,99	3713,74	236,05
666,68	4193,97	4367,98	4166,37	4112,80	4210,28	55,20
222,23	5052,96	5243,54	4745,18	4683,33	4931,25	131,79
78,08	4492,24	4516,56	4980,52	5108,95	4774,57	158,25
24,69	4468,27	4537,48	4816,14	4776,72	4649,65	86,29
8,23	4269,33	4298,94	4312,67	4556,08	4359,26	66,23
2,74	4373,00	4393,82	4342,72	4425,48	4383,76	17,42
0,91	4151,57	4252,93	4664,30	4540,30	4402,28	120,02
0,09	4507,50	4450,78	4160,25	4050,40	4292,23	110,82
0	3966,50	3927,60	4393,15	4335,60	4155,71	121,30
Spezifische Bindung [%]						
4000	46,62	47,63	45,03	44,99	46,07	0,65
2666,67	63,36	64,91	57,17	61,45	61,72	1,67
1333,35	84,16	83,42	92,59	96,25	89,10	3,16
666,68	105,73	111,21	94,84	94,86	101,66	4,09
222,23	127,39	133,50	108,01	108,02	119,23	6,59
78,08	113,25	115,00	113,37	117,84	114,86	1,07
24,69	112,65	115,53	109,63	110,17	112,00	1,35
8,23	107,63	109,45	98,17	105,09	105,09	2,47
2,74	110,25	111,87	98,85	102,07	105,76	3,15
0,91	104,67	108,28	106,17	104,72	105,96	0,85
0,09	113,64	113,32	94,70	93,42	103,77	5,61
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0

A.2. Transportexperimente durch Caco-2-Zellmonolayer

A.2.A. Einfluss der Kulturperiode auf intestinale Transportprozesse

A.2.A.I. Transportstudien (a-b) durch Caco-2-Zellmonolayer (Passage P78/79): Permeabilitätswerte [10^{-6} cm/sec] für ^{14}C - oder ^3H -markierte Modellsubstanzen (0,1 mM Donorkonzentration) nach 2 Wochen in Kultur

Substanz	Absorptionsart	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6	MW	SEM
^3H -R/S-Atenolol	Passiv	0,130	0,16	0,15	0,140	0,17	0,17	0,15	0,01
^3H -S-Baclofen	PepT1	1,20	1,25	1,26	1,30	1,40	1,29	1,28	0,03
^3H -Gly-Pro	PepT1	12,80	11,80	14,00	13,30	11,80	12,80	12,70	0,35
^{14}C -D-Mannitol	Passiv	0,12	0,11	0,12	0,13	0,13	0,12	0,12	0,01
^3H -R/S-Metoprolol	Passiv, P-GP	20,30	27,40	18,80	20,00	28,00	19,30	22,30	1,72
^{14}C -L-Phenylalanin	LAT	10,80	11,20	13,00	11,60	12,00	13,20	12,00	0,39
^3H -R/S-Propranolol	P-GP	20,10	20,20	18,70	21,00	21,00	20,10	20,20	0,34
^3H -R/S-Talinolol ab	P-GP	1,37	1,28	1,40	1,35	1,31	1,39	1,35	0,02
^3H -R/S-Talinolol ba	P-GP	7,74	7,73	8,56	9,16	8,81	9,45	8,57	0,29
TEER [Ω/cm^2]									
		778	728	497	409	1379	1405	866	209

A.2.A.II. Transportstudien (a-b) durch Caco-2-Zellmonolayer (Passage P78/79): Permeabilitätswerte [10^{-6} cm/sec] für ^{14}C - oder ^3H -markierte Modellsubstanzen (0,1 mM Donorkonzentration) nach 3 Wochen in Kultur

Substanz	Absorptionsart	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6	MW	SEM
^3H -R/S-Atenolol	Passiv	0,35	0,68	0,27	0,34	0,47	0,40	0,42	0,06
^{14}C -R/S-Baclofen	PepT1	0,61	0,59	0,70	0,62	0,60	0,69	0,64	0,02
^3H -S-Baclofen	PepT1	1,48	1,33	2,03	1,50	1,32	2,03	1,62	0,14
^3H -Gly-Pro	PepT1	13,20	13,50	14,70	14,20	14,10	14,70	14,00	0,24
^{14}C -D-Mannitol	Passiv	0,13	0,12	0,12	0,13	0,13	0,12	0,12	0,02
^3H -R/S-Metoprolol	Passiv, P-GP	22,60	21,00	23,20	22,40	21,40	23,20	22,30	0,38
^{14}C -L-Phenylalanin	LAT	11,30	12,00	15,00	11,80	12,10	13,90	12,70	0,58
^3H -R/S-Propranolol	P-GP	22,00	21,50	23,80	22,30	23,30	24,70	22,90	0,49
^3H -R/S-Talinolol ab	P-GP	1,23	1,41	1,37	1,26	1,46	1,41	1,35	0,04
^3H -R/S-Talinolol ba	P-GP	7,80	7,80	9,35	8,77	8,74	10,00	8,74	0,35
TEER [Ω/cm^2]									
		1148	1144	1138	1132	1109	1099	1128	174

A.2.A.III. Transportstudien durch Caco-2-Zellmonolayer (Passage P78/79): Permeabilitätswerte [10^{-6} cm/sec] für ^{14}C - oder ^3H -markierte Modellsubstanzen (0,1 mM Donorkonzentration) nach 4 Wochen in Kultur

Substanz	Absorptionsart	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6	MW	SEM
^3H -R/S-Atenolol	Passiv	0,14	0,15	0,17	0,13	0,15	0,19	0,16	0,001
^3H -S-Baclofen	PepT1	1,75	1,65	1,70	1,53	1,78	1,68	1,69	0,06
^3H -Gly-Pro	PepT1	17,30	16,80	19,60	17,50	17,10	19,60	18,00	0,52
^{14}C -D-Mannitol	Passiv	0,13	0,12	0,11	0,13	0,13	0,12	0,12	0,01
^3H -R/S-Metoprolol	Passiv, P-GP	18,60	17,50	-	19,70	18,60	-	18,60	0,37
^{14}C -L-Phenylalanin	LAT	19,00	18,10	22,70	19,60	20,10	22,50	20,30	0,77
^3H -R/S-Propranolol	P-GP	20,80	22,10	23,30	21,00	21,60	21,10	21,60	0,39
^3H -R/S-Talinolol ab	P-GP	1,33	1,27	1,32	1,36	1,27	1,39	1,33	0,02
^3H -R/S-Talinolol ba	P-GP	7,27	1,01	8,07	6,93	6,78	7,95	7,33	0,22
TEER [Ω/cm^2]									
		1173	1256	1193	1235	1185	1155	1199	14

A.2.B. Transportstudien mit Losartan und EXP 3174

A.2.B.I. Transportexperimente mit Losartan

A.2.B.I.a. Permeabilitätswerte von Losartan (0,25 mM Donorkonzentration) für unterschiedliche Caco-2-Passagen (Passage P30/31 und P78/79) nach 2 Wochen in Kultur; Permeabilitätswerte von ^{14}C -Mannitol als Kontrolle (0,1 mM Donorkonzentration)

	TEER	P_{eff} [10^{-6} cm/sec] a-b		TEER	P_{eff} [10^{-6} cm/sec] b-a	
	[Ω/cm^2]	^{14}C -Mannitol	Losartan	[Ω/cm^2]	^{14}C -Mannitol	Losartan
Passage P30/31; 2 Wochen in Kultur						
Well 1	191	0,16	1,10	167	0,18	8,35
Well 2	208	0,16	1,09	187	0,19	7,64
Well 3	187	0,16	1,09	162	0,17	8,21
MW	195	0,16	1,09	172	0,18	8,07
SEM	11	0,001	0,004	13	0,007	0,22
Passage P78/79; 2 Wochen in Kultur						
Well 1	347	0,33	1,48	337	0,33	8,10
Well 2	354	0,34	1,44	293	0,51	8,34
Well 3	340	0,24	1,45	257	0,52	8,12
MW	347	0,30	1,45	296	0,45	8,19
SEM	7	0,03	0,01	40	0,06	0,08

A.2.B.I.b. Permeabilitätswerte von Losartan (0,25 mM Donorkonzentration) für unterschiedliche Caco-2-Passagen (Passage P30/31 und P78/79) nach 3 Wochen in Kultur; Permeabilitätswerte von ¹⁴C-Mannitol als Kontrolle (0,1 mM Donorkonzentration)

	TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] a-b		TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] b-a	
	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	Losartan	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	Losartan
Passage P30/31; 3 Wochen in Kultur						
Well 1	189	1,11	1,74	199	0,17	9,33
Well 2	204	1,98	1,76	193	0,55	9,61
Well 3	210	0,95	1,76	184	1,01	9,07
MW	201	1,35	1,75	192	0,58	9,34
SEM	11	0,32	0,005	8	0,24	0,16
Passage P78/79; 3 Wochen in Kultur						
Well 1	420	0,43	1,50	267	0,72	9,63
Well 2	398	0,28	1,49	255	0,83	9,52
Well 3	357	0,53	1,47	223	0,97	9,67
MW	392	0,41	1,48	248	0,84	9,61
SEM	32	0,07	0,009	23	0,07	0,04

A.2.B.II. Einfluss von P-GP auf den Transport von Losartan – P-GP-Hemmung mit Verapamil

A.2.B.II.a. Permeabilitätswerte von Losartan (0,25 mM Donorkonzentration) für unterschiedliche Caco-2-Passagen (Passage P30/31 und P78/79) nach 2 Wochen in Kultur in Gegenwart von 0,5 mM Verapamil; Permeabilitätswerte von ¹⁴C-Mannitol als Kontrolle (0,1 mM Donorkonzentration) [Die Untersuchungen wurden gleichzeitig mit den in Tab.A.1.B.I.a. angegebenen Kontrolluntersuchungen durchgeführt.]

	TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] a-b		TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] b-a	
	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	Losartan	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	Losartan
Passage P30/31; 2 Wochen in Kultur						
Well 1	195	0,18	1,77	192	0,21	5,72
Well 2	207	0,18	1,82	208	0,18	5,75
Well 3	214	0,17	1,69	208	0,18	5,55
MW	205	0,18	1,76	203	0,19	5,67
SEM	10	0,002	0,04	9	0,009	0,06
Passage P78/79; 2 Wochen in Kultur						
Well 1	317	0,35	1,92	220	0,46	5,80
Well 2	305	0,36	1,98	180	0,61	5,82
Well 3	265	0,84	1,94	216	1,06	5,68
MW	296	0,52	1,95	205	0,71	5,77
SEM	27	0,16	0,02	22	0,18	0,05

A.2.B.II.b. Permeabilitätswerte von Losartan (0,25 mM Donorkonzentration) für unterschiedliche Caco-2-Passagen (Passage P30/31 und P78/79) nach 3 Wochen in Kultur in Gegenwart von 0,5 mM Verapamil; Permeabilitätswerte von ¹⁴C-Mannitol als Kontrolle (0,1 mM Donorkonzentration) [Die Untersuchungen wurden gleichzeitig mit den in Tab.A.1.B.I.b. angegebenen Kontrolluntersuchungen durchgeführt.]

	TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] a-b		TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] b-a	
	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	Losartan	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	Losartan
Passage P30/31; 3 Wochen in Kultur						
Well 1	210	0,80	2,98	200	0,60	7,67
Well 2	206	3,11	3,03	194	0,48	7,95
Well 3	205	0,38	3,03	195	0,97	7,86
MW	207	1,43	3,01	196	0,68	7,83
SEM	3	0,85	0,02	3	0,15	0,08
Passage P78/79; 3 Wochen in Kultur						
Well 1	366	0,36	2,17	225	0,89	6,17
Well 2	341	0,46	2,28	190	1,20	6,52
Well 3	288	0,56	2,20	240	1,18	6,62
MW	332	0,46	2,21	218	1,09	6,62
SEM	40	0,06	0,03	26	0,10	0,05

A.2.B.III. Transportexperimente mit EXP 3174

A.2.B.III.a. Permeabilitätswerte von EXP 3174 (0,25 mM Donorkonzentration) für unterschiedliche Caco-2-Passagen (Passage P30/31 und P78/79) nach 2 Wochen in Kultur; Permeabilitätswerte von ¹⁴C-Mannitol als Kontrolle (0,1 mM Donorkonzentration)

	TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] a-b		TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] b-a	
	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	EXP 3174	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	EXP 3174
Passage P30/31; 2 Wochen in Kultur						
Well 1	194	1,30	0,33	171	0,85	1,19
Well 2	221	0,19	0,34	183	0,29	1,16
Well 3	180	0,17	0,35	147	0,26	1,17
MW	198	0,55	0,34	167	0,47	1,17
SEM	21	0,37	0,006	18	0,19	0,009
Passage P78/79; 2 Wochen in Kultur						
Well 1	377	0,25	0,28	344	0,37	0,94
Well 2	316	0,31	0,29	366	0,21	0,90
Well 3	344	0,39	0,30	310	0,25	0,93
MW	346	0,32	0,29	340	0,28	0,92
SEM	31	0,04	0,007	28	0,05	0,01

A.2.B.III.b. Permeabilitätswerte von EXP 3174 (0,25 mM Donorkonzentration) für unterschiedliche Caco-2-Passagen (Passage P30/31 und P78/79) nach 3 Wochen in Kultur; Permeabilitätswerte von ¹⁴C-Mannitol als Kontrolle (0,1 mM Donorkonzentration)

	TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] a-b		TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] b-a	
	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	EXP 3174	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	EXP 3174
Passage P30/31; 3 Wochen in Kultur						
Well 1	208	0,51	0,56	180	2,58	1,66
Well 2	208	0,23	0,56	184	2,23	1,68
Well 3	171	0,73	0,58	189	1,47	1,65
MW	196	0,49	0,56	184	2,10	1,66
SEM	21	0,14	0,008	5	0,33	0,02
Passage P78/79; 3 Wochen in Kultur						
Well 1	398	0,28	0,34	303	1,14	0,88
Well 2	402	0,23	0,34	271	0,75	0,90
Well 3	360	0,36	0,36	232	0,54	0,90
MW	387	0,29	0,35	269	0,81	0,89
SEM	23	0,04	0,05	36	0,17	0,005

A.2.B.IV. Einfluss von P-GP auf den Transport von EXP 3174 – P-GP-Hemmung mit Verapamil

A.2.B.IV.a. Permeabilitätswerte von EXP 3174 (0,25 mM Donorkonzentration) für unterschiedliche Caco-2-Passagen (Passage P30/31 und P78/79) nach 2 Wochen in Kultur in Gegenwart von 0,5 mM Verapamil; Permeabilitätswerte von ¹⁴C-Mannitol als Kontrolle (0,1 mM Donorkonzentration) [Die Untersuchungen wurden gleichzeitig mit den in Tab.A.1.B.III.a. angegebenen Kontrolluntersuchungen durchgeführt.]

	TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] a-b		TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] b-a	
	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	EXP 3174	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	EXP 3174
Passage P30/31; 2 Wochen in Kultur						
Well 1	224	0,73	0,45	234	0,25	0,39
Well 2	199	0,64	0,45	239	0,19	0,39
Well 3	198	1,38	0,45	216	0,67	0,40
MW	207	0,91	0,45	230	0,37	0,39
SEM	15	0,23	0,001	12	0,15	0,003
Passage P78/79; 2 Wochen in Kultur						
Well 1	301	0,28	0,41	326	0,44	0,65
Well 2	271	0,45	0,43	373	0,96	0,65
Well 3	212	0,75	0,43	200	0,96	0,66
MW	261	0,49	0,42	300	0,79	0,66
SEM	45	0,14	0,006	89	0,18	0,002

A.2.B.IV.b. Permeabilitätswerte von EXP 3174 (0,25 mM Donorkonzentration) für unterschiedliche Caco-2-Passagen (Passage P30/31 und P78/79) nach 3 Wochen in Kultur in Gegenwart von 0,5 mM Verapamil; Permeabilitätswerte von ¹⁴C-Mannitol als Kontrolle (0,1 mM Donorkonzentration) [Die Untersuchungen wurden gleichzeitig mit den in Tab.A.1.B.III.b. angegebenen Kontrolluntersuchungen durchgeführt.]

	TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] a-b		TEER	P _{eff} [10 ⁻⁶ cm/sec] b-a	
	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	EXP 3174	[Ω/cm ²]	¹⁴ C-Mannitol	EXP 3174
Passage P30/31; 3 Wochen in Kultur						
Well 1	245	0,20	0,81	184	0,39	1,28
Well 2	218	1,28	0,85	181	1,39	1,32
Well 3	204	2,17	0,72	190	2,13	1,30
MW	222	1,22	0,79	185	1,31	1,30
SEM	21	0,57	0,04	5	0,50	0,01
Passage P78/79; 3 Wochen in Kultur						
Well 1	388	0,41	0,53	295	0,40	0,73
Well 2	335	0,55	0,52	231	0,66	0,74
Well 3	265	0,90	0,52	203	0,66	0,73
MW	329	0,62	0,52	243	0,57	0,73
SEM	62	0,15	0,002	47	0,09	0,003

B. Rohdaten der In-situ-Perfusionsstudien

B.1. In-situ-Perfusionen mit Losartan

B.1.A. Effektive intestinale Permeabilitäten (P_{eff}) von Losartan

B.1.A.I. Intestinale Permeabilitäten von Losartan (initial: 0,01 mM Losartan-Perfusatkonzentration)

		Ileum			Jejunum		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
P_{eff} [10^{-5} cm/sec]	0	13,20	14,30	8,87	-	5,32	10,50
	5	9,48	9,19	12,90	15,10	18,60	25,30
	10	11,60	7,52	10,90	9,81	-7,13	17,20
	15	14,20	15,90	5,12	7,04	5,20	-6,34
	20	15,40	32,80	9,90	6,58	0,21	8,67
	25	11,50	27,00	-	11,90	7,53	25,60
	30	10,50	14,40	17,00	6,54	4,59	8,14
	35	-0,05	8,16	-2,20	-2,67	10,80	17,90
	40	10,90	10,30	-4,19	10,70	6,84	5,96
	45	18,70	15,00	11,40	14,00	-1,03	9,88
	50	16,50	20,80	13,70	4,74	6,81	-7,12
	55	18,70	25,60	9,03	11,00	2,76	6,92
	60	5,08	19,10	14,00	13,50	7,61	7,62
	65	6,96	19,40	-1,65	16,90	9,39	6,20
	70	-	23,90	-1,13	9,18	10,20	6,71
	75	6,14	7,42	-	11,10	-2,57	6,96
	80	-0,07	11,30	-	11,30	4,38	17,20
	85	3,72	10,60	-	4,25	1,48	6,77
	90	-0,03	18,90	14,70	0,74	9,43	5,30
	MW	9,51	16,40	6,89	8,99	4,84	9,44
	SEM	1,44	1,67	2,10	1,16	1,31	1,95
Gewicht der Ratte [g]		356	340	365	356	340	365
Länge des Segments [cm]		4,00	4,00	5,00	8,00	5,00	7,00

B.1.B. Einfluss von Inhibitoren intestinaler Transportsysteme auf die effektive intestinale Permeabilität von Losartan

B.1.B.I. Einfluss von 0,01 mM EXP 3174 auf die effektive Permeabilität von Losartan (initial: 0,01 mM Losartan-Perfusatkonzentration)

		Losartan			Losartan + EXP 3174		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		4,00	4,20	3,5	4,00	4,20	3,5
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	3,50	19,30	22,60	7,54	8,52	0,80
	5	14,00	23,20	3,67	0,76	8,22	8,68
	10	14,10	26,30	14,70	-	-	-
	15	-2,66	-0,29	-0,28	37,60	40,50	39,50
	20	18,00	15,20	14,80	-1,01	-1,14	-1,11
	25	24,50	15,00	18,90	33,90	36,50	35,60
	30	21,50	3,76	25,7	4,28	4,60	4,49
	MW	13,60	14,60	14,30	13,80	15,00	14,70
	SEM	3,43	3,69	3,60	6,53	7,02	6,84
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		8,00	7,40	7,60	8,00	7,40	7,60
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	9,17	7,53	11,7	10,50	14,00	7,67
	5	11,10	9,87	17,1	5,11	14,90	9,24
	10	7,00	9,86	1,11	13,80	7,86	12,30
	15	9,16	14,40	9,80	11,80	12,70	6,27
	20	9,34	1,14	9,62	8,80	7,95	14,50
	25	10,60	17,50	7,35	7,30	5,50	5,36
	30	16,30	12,00	9,63	5,97	9,47	11,00
	MW	9,02	10,30	9,47	9,04	10,30	9,49
	SEM	1,72	1,97	1,01	1,20	1,34	1,26
Gewicht der Ratte [g]		375	365	380	375	365	380

B.1.B.II. Einfluss von kompetitiven P-GP- und MRP1-Inhibitoren auf die effektive Permeabilität von Losartan – Verapamil, Vinblastin, Calcein

B.1.B.II.a. Intestinale Permeabilitäten von Losartan (initial: 0,01 mM Losartan-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 0,5 mM Verapamil (P-GP-Inhibitor) im Perfusat

		Losartan			Losartan + Verapamil		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		9,50	6,00	5,30	9,50	6,00	5,30
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	8,08	15,20	14,20	14,50	11,90	13,40
	5	11,40	12,70	18,30	14,40	19,10	17,10
	10	2,94	14,10	11,60	8,38	20,10	17,10
	15	14,10	19,00	12,90	20,10	25,20	6,89
	20	7,31	12,20	14,00	10,70	12,50	25,70
	25	21,20	14,60	10,10	19,60	27,70	26,40
	30	7,35	27,40	17,40	5,70	21,20	21,10
	MW	10,30	16,50	14,10	13,30	19,70	18,20
	SEM	2,24	2,00	1,11	2,08	2,23	2,61
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		5,20	8,50	6,00	5,20	8,50	6,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	12,70	12,30	17,70	22,20	20,60	13,90
	5	9,16	3,11	2,30	14,90	24,70	14,80
	10	13,00	11,70	14,44	21,90	18,60	1,21
	15	12,60	14,80	9,40	15,00	7,48	4,68
	20	11,90	16,60	16,80	3,43	16,30	2,89
	25	18,20	12,70	14,10	20,90	22,90	21,20
	30	13,50	19,00	14,90	27,30	12,40	38,80
	MW	13,00	12,90	12,80	17,90	17,60	13,90
	SEM	1,01	1,90	2,02	2,92	2,29	4,98
Gewicht der Ratte [g]		370	355	360	370	355	360

B.1.B.II.b. Intestinale Permeabilitäten von Losartan (initial: 0,01 mM Losartan-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 0,1 mM Vinblastin (P-GP-Inhibitor) im Perfusat

		Losartan			Losartan + Vinblastin		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		4,90	5,90	4,20	4,90	5,90	4,20
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	13,30	7,11	22,30	21,30	13,70	35,40
	5	21,10	26,30	22,20	32,00	31,90	25,60
	10	16,00	15,90	14,70	24,80	28,20	61,60
	15	13,50	13,20	10,30	-	63,70	39,80
	20	11,50	38,40	4,35	35,50	59,40	31,70
	25	23,00	-0,16	31,00	40,40	32,60	24,00
	30	4,82	19,60	6,03	-0,33	8,71	27,10
	MW	14,80	17,20	15,90	25,10	34,00	35,00
	SEM	2,30	4,78	3,69	5,88	7,90	4,91
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		8,50	12,00	6,40	8,50	12,00	6,40
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	5,35	5,10	12,60	16,50	16,90	16,60
	5	12,60	7,30	5,31	25,20	17,60	22,00
	10	11,00	11,60	15,70	41,30	11,80	19,00
	15	60,00	3,27	10,90	13,20	13,70	20,80
	20	-1,28	11,70	8,81	16,10	40,0	16,70
	25	18,10	11,30	12,50	17,60	10,60	4,28
	30	15,70	26,30	21,40	12,80	20,20	16,10
	MW	17,40	10,90	12,50	20,40	18,70	16,50
	SEM	7,52	2,86	1,93	3,82	3,78	2,21
Gewicht der Ratte [g]							
		349	360	375	349	360	375

B.1.B.II.c. Intestinale Permeabilitäten von Losartan (initial: 0,01 mM Losartan-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 1 mM Calcein (MRP1-Inhibitor) im Perfusat

		Losartan			Losartan + Calcein		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		5,00	4,80	5,00	5,00	4,80	5,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	19,50	8,23	12,00	16,80	34,50	23,60
	5	7,35	8,74	1,56	26,90	33,20	25,90
	10	9,90	5,47	18,50	12,90	35,50	30,20
	15	11,70	10,40	11,10	-	18,10	17,10
	20	12,90	9,01	3,77	-	24,90	30,00
	25	15,00	6,56	5,36	-	33,20	19,80
	30	12,70	7,23	3,42	-	11,20	35,10
	MW	11,10	7,95	7,95	18,90	27,20	26,00
	SEM	2,19	0,63	2,30	2,75	3,58	2,39
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		6,00	7,20	5,60	6,00	7,20	5,60
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	4,73	6,49	9,58	11,80	11,50	14,60
	5	6,45	7,99	5,85	7,92	10,80	12,60
	10	2,69	8,61	9,48	7,53	14,00	15,10
	15	9,86	8,87	5,82	38,60	14,90	20,60
	20	8,66	7,27	5,80	13,30	21,90	14,60
	25	6,23	5,50	5,31	11,60	16,50	11,90
	30	9,59	6,11	6,53	19,40	17,90	12,70
	MW	6,89	7,26	5,68	14,70	15,40	14,60
	SEM	1,00	0,49	0,95	4,09	1,45	1,10
Gewicht der Ratte [g]							
		302	320	310	302	320	310

B.1.B.III. Einfluss von MRP2/cMOAT-Inhibitoren auf die effektive Permeabilität von Losartan – Indometacin, Probenecid

B.1.B.III.a. Intestinale Permeabilitäten von Losartan (initial: 0,01 mM Losartan-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 1 mM Indometacin im Perfusat

		Losartan			Losartan + Indometacin		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		5,7	4,5	6,0	5,7	4,5	6,0
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	6,75	7,09	7,96	10,80	11,30	12,70
	5	0,71	0,78	0,84	25,70	27,00	30,30
	10	13,20	13,80	15,50	25,80	27,00	30,40
	15	21,80	22,90	25,70	24,60	25,80	29,00
	20	12,50	13,20	14,80	-	-	-
	25	23,60	24,80	27,80	15,60	16,40	18,40
	30	18,00	18,90	21,20	15,20	15,90	17,90
	MW	13,80	14,50	16,30	19,60	20,60	23,10
	SEM	3,09	3,24	3,64	2,46	2,59	2,91
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		8,50	7,80	6,50	8,50	7,80	6,50
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	4,47	4,69	5,27	8,04	8,44	9,48
	5	3,38	3,55	3,98	8,61	9,04	10,10
	10	9,17	9,63	10,80	23,10	24,30	27,30
	15	8,88	9,33	10,50	17,60	18,50	20,70
	20	10,40	11,00	12,30	15,80	16,60	18,60
	25	6,86	7,20	8,08	12,70	13,40	15,00
	30	6,31	6,63	7,44	5,02	5,27	5,92
	MW	7,07	7,43	8,34	13,00	13,60	15,30
	SEM	0,98	1,03	1,15	2,39	2,51	2,81
Gewicht der Ratte [g]		335	350	365	335	350	365

B.1.B.III.b. Intestinale Permeabilitäten von Losartan (initial: 0,01 mM Losartan-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 1 mM Probenecid im Perfusat

		Losartan			Losartan + Probenecid		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		5,00	6,50	5,80	5,00	6,50	5,80
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	12,60	8,01	9,70	1,97	1,18	44,80
	5	10,20	6,46	11,80	9,34	5,59	8,89
	10	12,40	7,89	12,00	46,3	27,70	36,10
	15	15,70	9,99	32,50	37,9	22,70	14,50
	20	10,40	6,59	13,20	15,2	9,10	35,80
	25	34,10	21,70	9,83	19,9	11,40	18,10
	30	13,90	8,82	15,00	37,6	22,50	1,88
	MW	15,60	9,92	14,90	23,90	12,50	22,80
	SEM	3,17	2,01	3,02	6,30	5,08	6,02
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		5,60	7,00	7,80	5,60	7,00	7,80
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	7,65	8,22	14,60	23,30	2,39	25,10
	5	4,56	0,30	4,94	15,40	5,73	24,30
	10	4,87	9,56	18,30	28,20	8,32	29,00
	15	-	5,54	5,81	32,40	3,39	18,80
	20	24,20	10,70	7,58	18,50	36,80	19,20
	25	5,64	3,76	2,55	37,90	8,40	11,10
	30	16,50	11,30	8,33	32,30	15,55	13,50
	MW	10,60	7,06	8,87	26,80	11,50	20,10
	SEM	3,03	1,53	2,12	3,08	4,52	2,44
Gewicht der Ratte [g]							
		378	387	395	378	387	395

B.1.B.IV. Einfluss des MCT1-Inhibitors Benzoessäure auf die effektive Permeabilität von Losartan

B.1.B.IV.a. Intestinale Permeabilitäten von Losartan (initial: 0,01 mM Losartan-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 1 mM Benzoessäure im Perfusat

		Losartan			Losartan + Benzoessäure		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		5,00	4,50	5,60	5,00	4,50	5,60
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	7,11	6,76	8,39	12,20	11,60	14,40
	5	6,95	6,60	8,19	2,70	2,57	3,18
	10	5,57	5,29	6,57	9,80	9,31	11,00
	15	15,60	14,80	18,40	10,10	9,57	11,90
	20	16,90	16,10	19,90	6,44	8,97	7,59
	25	6,48	6,16	7,64	9,44	4,74	10,06
	30	3,54	3,36	3,97	13,00	12,30	15,33
	MW	8,88	8,43	9,95	8,88	8,44	9,96
	SEM	1,96	1,86	2,20	1,41	1,34	1,58
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		7,00	7,50	6,00	7,00	7,50	6,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	8,52	8,95	10,00	12,60	13,20	14,80
	5	8,26	8,67	9,74	3,15	3,31	3,72
	10	2,99	3,14	3,52	4,66	4,90	5,50
	15	1,38	1,45	1,63	3,07	3,23	3,62
	20	7,92	8,31	9,33	1,85	1,94	2,17
	25	6,58	6,91	7,76	5,08	5,33	5,99
	30	1,30	1,36	1,53	6,75	7,09	7,96
	MW	5,28	5,54	6,22	5,31	5,57	6,26
	SEM	1,24	1,30	1,46	1,36	1,42	1,60
Gewicht der Ratte [g]		335	288	320	335	288	320

B.1.B.V. Einfluss von Coffein und Taurin auf die effektive Permeabilität von Losartan

B.1.B.V.a. Intestinale Permeabilitäten von Losartan (initial: 0,01 mM Losartan-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 0,6 mM Coffein im Perfusat

		Losartan			Losartan + Coffein		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		4,70	5,50	6,00	4,70	5,50	6,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	9,86	9,59	9,76	8,12	8,02	8,25
	5	9,47	9,58	9,27	7,91	8,06	8,44
	10	9,30	9,27	9,73	8,01	7,82	8,54
	15	9,07	8,28	9,11	8,23	8,10	8,57
	20	9,32	9,22	9,75	8,34	7,93	8,31
	25	9,19	8,47	10,00	8,02	8,06	8,38
	30	8,65	9,93	10,20	8,13	7,58	8,47
	MW	9,27	9,19	9,69	8,11	7,94	8,42
	SEM	0,14	0,23	0,15	0,06	0,07	0,04
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		5,50	6,40	7,00	5,50	6,40	7,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	6,09	5,73	6,36	5,24	4,86	5,69
	5	6,46	6,69	6,86	5,11	5,03	5,54
	10	6,33	6,27	7,31	5,24	5,05	5,41
	15	6,62	5,84	6,54	5,17	4,95	5,31
	20	7,06	6,87	6,61	5,22	5,09	5,40
	25	6,88	6,18	6,90	5,49	5,06	5,33
	30	6,21	5,90	6,21	5,81	5,03	5,30
	MW	6,52	6,21	6,68	5,33	5,01	5,43
	SEM	0,13	0,16	0,14	0,09	0,03	0,05
Gewicht der Ratte [g]		384	375	390	384	375	390

B.1.B.V.b. Intestinale Permeabilitäten von Losartan (initial: 0,01 mM Losartan-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 32 mM Taurin im Perfusat

		Losartan			Losartan + Taurin		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		4,00	3,50	5,00	4,00	3,50	5,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	8,93	11,20	9,88	8,74	10,10	9,56
	5	8,57	9,25	9,71	8,76	9,40	9,23
	10	9,42	9,35	9,86	8,56	10,70	9,29
	15	8,65	10,50	10,00	8,21	9,48	9,29
	20	8,92	9,86	9,85	8,29	9,42	10,10
	25	9,17	9,32	9,36	8,42	9,16	9,53
	30	8,48	10,30	10,60	8,79	9,42	9,90
	MW	8,88	8,97	9,90	8,54	9,67	9,56
	SEM	0,13	0,28	0,14	0,09	0,20	0,13
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		4,70	6,00	5,50	4,70	6,00	5,50
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	7,23	6,51	6,98	6,50	5,78	6,40
	5	6,40	5,91	6,41	6,25	5,72	6,49
	10	5,38	4,49	7,21	6,41	5,83	6,01
	15	6,62	6,20	6,73	6,28	5,38	6,12
	20	6,42	7,32	5,18	6,17	5,28	6,43
	25	6,60	5,61	6,47	6,57	5,79	6,28
	30	8,24	5,06	7,21	6,22	5,97	6,45
	MW	6,70	5,87	6,60	6,34	5,68	6,31
	SEM	0,33	0,35	0,27	0,06	0,09	0,69
Gewicht der Ratte [g]							
		371	400	405	371	400	405

B.2. In-situ-Perfusionen mit EXP 3174**B.2.A. Effektive intestinale Permeabilitäten (P_{eff}) von EXP 3174****B.2.A.I. Intestinale Permeabilitäten von EXP 3174 (initial: 0,01 mM EXP 3174-Perfusatkonzentration)**

		Ileum			Jejunum		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
P_{eff} [10^{-5} cm/sec]	0	8,88	18,70	15,70	7,39	8,25	2,65
	5	26,90	-2,72	15,60	4,09	9,78	15,60
	10	12,40	1,02	2,35	0,88	9,48	1,82
	15	12,60	18,40	20,6	0,43	6,23	21,20
	20	-3,54	13,80	19,80	-6,17	5,32	5,00
	25	19,10	15,20	-3,22	1,76	1,22	6,97
	30	6,87	29,30	45,60	-2,71	7,22	2,81
	35	-2,19	-1,07	-1,43	2,35	1,57	9,25
	40	14,10	2,13	-4,56	1,68	3,70	4,25
	45	3,76	7,70	6,57	4,21	0,47	6,48
	50	4,98	25,60	13,10	6,14	2,54	0,75
	55	4,13	-2,15	-1,49	-2,51	-3,00	11,40
	60	6,02	4,03	19,60	0,51	4,37	2,63
	65	8,45	-7,51	13,60	5,26	2,94	9,90
	70	22,30	1,27	29,70	5,11	2,68	0,57
	75	18,80	17,40	12,10	-4,71	-4,78	9,39
	80	11,70	10,00	-0,92	-2,32	6,35	3,13
	85	4,95	-6,52	11,60	3,39	4,69	10,10
	90	12,20	21,10	12,50	4,89	6,53	3,16
	MW	10,10	8,57	8,60	2,67	3,98	6,69
	SEM	1,81	2,61	4,07	1,45	0,89	1,24
Gewicht der Ratte [g]		356	340	365	356	340	365
Länge des Segments [cm]		4,00	4,00	5,00	8,00	5,00	7,00

B.2.B. Einfluss von Inhibitoren intestinaler Transportsysteme auf die effektive intestinale Permeabilität von EXP 3174

B.2.B.I. Einfluss von 0,01 mM Losartan auf die effektive Permeabilität von EXP 3174 (initial: 0,01 mM EXP 3174-Perfusatkonzentration)

		EXP 3174			EXP 3174 + Losartan		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		4,00	5,50	3,50	4,00	5,50	3,50
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	10,70	8,24	4,60	9,55	9,91	9,92
	5	6,30	10,10	10,80	-	5,48	4,73
	10	11,90	9,93	8,35	1,95	19,70	10,10
	15	3,85	7,46	5,94	9,81	9,01	9,88
	20	7,53	8,38	11,50	14,20	5,17	11,40
	25	11,70	8,95	8,63	-	4,51	5,75
	30	8,16	6,32	9,95	10,10	8,76	10,20
	MW	8,59	8,49	8,97	9,12	8,94	8,86
	SEM	1,14	0,51	0,73	1,67	1,97	0,96
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		5,70	7,50	8,00	5,70	7,50	8,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	3,16	5,37	4,95	1,51	29,10	6,61
	5	18,20	6,26	7,27	0,51	4,76	6,60
	10	3,91	2,80	10,10	6,91	2,84	9,71
	15	7,53	7,79	8,04	10,10	2,65	6,69
	20	5,13	14,20	3,52	16,50	2,03	5,12
	25	5,64	8,20	12,80	6,96	5,60	2,77
	30	-	4,72	4,48	9,12	3,48	16,10
	MW	7,25	7,05	7,32	7,37	7,21	7,65
	SEM	2,10	1,38	1,26	2,04	3,68	1,61
Gewicht der Ratte [g]		350	341	345	350	341	345

B.2.B.II. Einfluss von kompetitiven P-GP- und MRP1-Inhibitoren auf die effektive Permeabilität von EXP 3174 – Verapamil, Vinblastin, Calcein

B.2.B.II.a. Intestinale Permeabilitäten von EXP 3174 (initial: 0,01 mM EXP 3174-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 0,5 mM Verapamil (P-GP-Inhibitor) im Perfusat

		EXP 3174			EXP 3174 + Verapamil		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		9,50	6,00	5,30	9,50	6,00	5,30
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	-2,20	11,50	13,10	10,50	10,90	5,93
	5	5,31	14,50	8,02	4,91	10,70	11,60
	10	9,57	9,85	10,20	6,22	8,52	32,70
	15	5,34	9,10	3,80	4,90	11,50	11,60
	20	9,17	6,19	12,70	2,08	7,34	17,20
	25	7,62	5,37	5,34	7,00	8,69	3,25
	30	3,29	3,85	10,60	4,19	17,20	12,00
	MW	5,44	8,62	9,10	5,68	10,70	9,26
	SEM	1,53	1,41	1,34	0,99	1,22	1,98
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		5,20	8,50	6,00	5,20	8,50	6,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	13,70	7,43	3,44	6,18	7,82	8,68
	5	2,12	7,98	1,09	5,65	6,74	17,30
	10	3,67	5,12	15,60	10,80	8,71	13,60
	15	10,90	8,98	0,67	8,84	7,34	15,30
	20	4,21	2,37	13,30	6,54	6,41	4,69
	25	5,08	6,08	32,80	10,90	7,04	1,24
	30	2,06	4,56	10,00	4,80	7,84	9,08
	MW	5,96	6,07	11,00	7,68	7,42	9,97
	SEM	1,71	0,86	4,27	0,95	0,29	2,19
Gewicht der Ratte [g]		370	355	360	370	355	360

B.2.B.II.b. Intestinale Permeabilitäten von EXP 3174 (initial: 0,01 mM EXP 3174-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 0,1 mM Vinblastin (P-GP-Inhibitor) im Perfusat

		EXP 3174			EXP 3174 + Vinblastin		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		4,90	5,90	4,20	4,90	5,90	4,20
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	12,00	-2,62	11,70	12,50	0,96	-
	5	-1,81	10,30	8,53	16,70	-1,43	12,00
	10	11,80	14,50	23,70	7,24	4,49	17,90
	15	9,04	5,52	14,90	-	22,30	0,02
	20	2,56	30,80	4,79	5,29	6,40	14,60
	25	8,14	-1,37	2,66	5,78	7,13	6,35
	30	8,16	19,50	3,15	-1,42	10,10	-
	MW	7,13	11,00	9,92	13,50	15,40	10,20
	SEM	1,90	4,49	2,86	4,33	8,62	2,67
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		8,50	12,00	6,40	8,50	12,00	6,40
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	2,96	3,24	14,00	9,60	10,60	13,10
	5	13,90	4,57	2,96	20,20	10,90	12,90
	10	0,95	7,34	8,85	13,00	11,30	11,10
	15	6,32	7,10	11,40	9,21	5,32	9,00
	20	-5,46	7,94	0,33	37,00	25,50	5,45
	25	12,70	9,09	13,20	11,20	8,60	-2,47
	30	10,70	18,10	11,00	1,78	5,67	8,83
	MW	14,10	8,19	7,41	14,60	11,10	8,28
	SEM	5,60	1,81	2,21	4,26	2,56	2,05
Gewicht der Ratte [g]							
		349	360	375	349	360	375

B.2.B.II.c. Intestinale Permeabilitäten von EXP 3174 (initial: 0,01 mM EXP 3174-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 1 mM Calcein (MRP1-Inhibitor) im Perfusat

		EXP 3174			EXP 3174 + Calcein		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		5,00	4,80	5,00	5,00	4,80	5,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	6,95	7,20	5,44	8,19	8,83	8,74
	5	-2,46	11,20	4,81	10,60	13,70	10,70
	10	6,06	5,78	7,47	10,30	6,58	6,48
	15	-1,85	2,00	1,93	-	7,75	3,88
	20	7,82	3,25	3,49	-	5,17	7,30
	25	8,91	8,11	8,02	-	8,65	10,10
	30	4,56	8,12	3,63	-	8,74	8,84
	MW	4,29	6,52	4,97	9,72	8,48	8,00
	SEM	1,74	1,18	0,83	0,50	1,00	0,88
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		6,00	7,20	5,60	6,00	7,20	5,60
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	2,66	1,62	-5,09	6,64	10,20	0,35
	5	1,51	1,30	4,48	6,01	10,50	11,90
	10	1,33	3,34	12,60	0,90	10,20	11,50
	15	1,63	0,42	2,33	6,15	10,80	13,10
	20	6,67	2,10	5,37	7,49	10,60	8,35
	25	1,83	2,31	5,17	8,06	6,09	10,60
	30	8,48	2,27	7,07	13,30	10,50	5,64
	MW	3,45	1,91	4,57	6,94	9,86	8,79
	SEM	1,10	0,35	2,02	1,38	0,63	1,70
Gewicht der Ratte [g]							
		302	320	310	302	320	310

B.2.B.III. Einfluss von MRP2/cMOAT-Inhibitoren auf die effektive Permeabilität von EXP 3174 – Indometacin, Probenecid

B.2.B.III.a. Intestinale Permeabilitäten von EXP 3174 (initial: 0,01 mM EXP 3174-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 1 mM Indometacin im Perfusat

		EXP 3174			EXP 3174 + Indometacin		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		5,7	4,5	6,0	5,7	4,5	6,0
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	4,25	6,02	9,75	-	8,79	7,83
	5	8,27	4,47	-	3,66	6,98	5,13
	10	5,73	-	5,01	0,85	-	1,00
	15	-	8,69	6,76	8,38	0,90	-
	20	1,06	1,11	1,92	4,35	3,84	4,31
	25	1,63	1,71	1,25	6,65	4,57	9,87
	30	-	-	-	-	-	-
	MW	4,19	4,40	4,94	4,78	5,02	5,63
	SEM	1,12	1,18	1,33	1,09	1,14	1,29
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		8,50	7,80	6,50	8,50	7,80	6,50
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	0,73	-	0,87	0,34	0,35	0,39
	5	-	0,77	1,40	7,48	7,86	8,82
	10	1,19	1,25	9,28	6,16	6,47	7,26
	15	7,87	8,26	-	4,88	5,12	5,75
	20	6,33	6,65	7,46	4,95	5,20	5,84
	25	2,14	2,24	2,52	2,72	2,85	3,20
	30	1,08	1,13	1,27	0,55	0,58	0,65
	MW	3,22	3,38	3,80	3,87	4,06	4,56
	SEM	1,16	1,22	1,37	1,04	1,09	1,22
Gewicht der Ratte [g]		335	350	365	335	350	365

B.2.B.III.b. Intestinale Permeabilitäten von EXP 3174 (initial: 0,01 mM EXP 3174-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 1 mM Probenecid im Perfusat

		EXP 3174			EXP 3174 + Probenecid		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		5,00	6,50	5,80	5,00	6,50	5,80
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	13,70	2,05	8,25	3,23	14,30	9,21
	5	-	-	4,28	-	2,02	2,12
	10	2,02	6,13	7,60	22,10	9,10	16,40
	15	6,91	7,56	8,65	33,30	0,80	17,90
	20	9,45	7,02	-	2,21	8,93	5,84
	25	4,35	10,10	7,56	0,90	13,20	7,42
	30	0,09	3,58	1,93	0,18	1,50	0,88
	MW	6,08	6,06	6,38	10,30	7,13	8,54
	SEM	1,89	1,09	1,01	2,28	2,15	2,48
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		5,60	7,00	7,80	5,60	7,00	7,80
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	5,72	-0,57	-6,87	-1,19	0,55	14,70
	5	-6,54	-	2,70	25,50	2,38	-0,33
	10	1,64	7,29	4,69	6,81	12,30	10,00
	15	2,70	3,19	3,09	-1,51	0,69	3,98
	20	14,90	9,14	12,60	2,41	5,18	-0,43
	25	10,90	8,01	9,92	-0,36	0,16	-0,11
	30	-	1,63	1,72	27,20	9,89	19,50
	MW	4,88	4,78	3,98	8,41	4,45	6,75
	SEM	2,84	1,48	2,37	4,76	1,85	3,05
Gewicht der Ratte [g]							
		378	387	395	378	387	395

B.2.B.IV. Einfluss des MCT1-Inhibitors Benzoessäure auf die effektive Permeabilität von EXP 3174
B.2.B.IV.a. Intestinale Permeabilitäten von EXP 3174 (initial: 0,01 mM EXP 3174-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 1 mM Benzoessäure im Perfusat

		EXP 3174			EXP 3174 + Benzoessäure		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		5,00	4,50	5,60	5,00	4,50	5,60
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	9,08	-6,31	46,00	4,46	14,30	0,02
	5	-1,26	-6,56	1,53	2,65	4,92	34,60
	10	13,00	4,14	-1,48	29,40	0,02	3,13
	15	39,00	41,00	-7,09	0,17	30,80	5,26
	20	39,40	13,70	10,70	-	2,79	-
	25	-6,25	-1,32	-7,66	13,60	4,69	16,10
	30	-6,01	9,53	4,64	4,69	-	5,53
	MW	7,36	7,73	8,67	9,14	9,59	10,80
	SEM	2,95	6,25	7,01	4,13	4,33	4,86
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		7,00	7,50	6,00	7,00	7,50	6,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	6,04	3,57	1,79	20,80	0,25	0,32
	5	12,70	4,64	1,99	-	9,79	-
	10	1,69	7,18	15,00	9,32	6,17	24,50
	15	1,52	1,60	7,12	0,27	21,80	-
	20	6,84	1,77	8,06	5,87	-	6,92
	25	4,42	13,40	5,21	-	0,28	-
	30	3,40	6,34	4,00	0,23	-	0,28
	MW	5,23	5,50	6,17	7,29	7,66	8,60
	SEM	1,46	1,54	1,73	3,20	3,36	3,77
Gewicht der Ratte [g]		335	288	320	335	288	320

B.2.B.V. Einfluss von Coffein und Taurin auf die effektive Permeabilität von EXP 3174

B.2.B.V.a. Intestinale Permeabilitäten von EXP 3174 (initial: 0,01 mM EXP 3174-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 0,6 mM Coffein im Perfusat

		EXP 3174			EXP 3174 + Coffein		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		4,70	5,50	6,00	4,70	5,50	6,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	6,88	6,26	5,53	3,46	3,36	3,82
	5	5,85	5,74	6,66	3,54	3,50	3,95
	10	5,10	6,12	6,30	3,75	3,51	3,80
	15	6,19	5,27	6,02	3,68	3,51	3,79
	20	5,21	6,79	5,89	3,58	3,66	3,81
	25	5,94	6,74	6,09	3,60	3,92	3,70
	30	5,62	4,92	6,90	3,50	3,78	3,58
	MW	5,83	5,98	6,20	3,59	3,61	3,78
	SEM	0,23	0,27	0,18	0,04	0,07	0,04
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		5,50	6,40	7,00	5,50	6,40	7,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	4,89	4,34	3,30	3,50	2,36	3,26
	5	4,54	5,02	3,99	3,43	2,41	3,03
	10	5,71	4,64	3,99	3,43	2,40	3,00
	15	4,96	4,46	4,95	3,56	2,35	3,10
	20	4,37	3,22	5,43	3,35	2,37	3,06
	25	4,32	3,27	5,02	3,40	2,36	3,07
	30	4,39	1,90	4,85	3,86	2,35	3,08
	MW	4,74	3,84	4,50	3,50	2,37	3,08
	SEM	0,19	0,41	0,29	0,06	0,01	0,04
Gewicht der Ratte [g]		384	375	390	384	375	390

B.2.B.V.b. Intestinale Permeabilitäten von EXP 3174 (initial: 0,01 mM EXP 3174-Perfusatkonzentration) ohne und mit Zusatz von 32 mM Taurin im Perfusat

		EXP 3174			EXP 3174 + Taurin		
	Zeit [min]	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum							
Länge des Segments [cm]		4,00	3,50	5,00	4,00	3,50	5,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	6,89	5,93	2,08	5,99	6,54	6,28
	5	8,90	6,77	7,22	5,96	5,94	6,20
	10	6,21	6,34	6,35	6,18	6,20	6,51
	15	5,71	5,67	5,97	6,36	6,26	6,63
	20	6,00	6,10	6,59	6,50	5,90	6,50
	25	7,64	6,12	8,23	6,67	5,14	6,25
	30	3,03	6,66	6,73	6,12	5,84	6,58
	MW	6,34	6,23	6,60	6,25	5,98	6,42
	SEM	0,69	0,15	0,37	0,10	0,17	0,07
Jejunum							
Länge des Segments [cm]		4,70	6,00	5,50	4,70	6,00	5,50
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	3,24	4,84	4,36	4,28	4,23	4,89
	5	4,82	4,30	5,09	4,34	4,00	4,74
	10	5,90	4,82	4,78	4,25	3,79	4,79
	15	4,46	4,73	4,82	4,53	4,40	4,69
	20	4,97	4,13	5,63	4,41	4,72	4,22
	25	4,77	4,92	4,79	4,27	4,75	4,38
	30	4,86	3,44	4,24	5,12	4,20	4,47
	MW	4,72	4,45	4,82	4,46	4,30	4,60
	SEM	0,29	0,20	0,18	0,12	0,13	0,09
Gewicht der Ratte [g]							
		371	400	405	371	400	405

B.3. Tageszeitliche Effekte bei In-situ-Perfusionen**B.3.A. Untersuchungen mit Losartan****B.3.A.I. Tageszeitlicher Einfluss auf die effektive intestinale Permeabilität**

B.3.A.I.a Permeabilitäten in der Ruhephase: Intestinale Permeabilitäten von Losartan (initial: 0,01 mM Losartan-Perfusatkonzentration) bei Perfusionen am Tag ohne und mit verschiedenen P-GP-Inhibitoren (Perfusatkonzentrationen: 0,5 mM Verapamil (VERA); 0,01 mM EXP 3174 (EXP) und 0,02 mM PSC 833 (PSC))

	Zeit [min]	Losartan			Losartan + Vinblastin			Losartan +		
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	VERA	EXP	PSC
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum										
Länge des Segments [cm]		3,70	3,60	3,60	3,70	3,60	3,60	3,70	3,60	3,60
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	-	-	-	20,40	25,40	22,70	21,80	10,40	24,10
	5	13,40	13,10	11,50	12,90	21,80	21,80	14,10	9,19	10,40
	10	10,10	10,30	11,80	11,00	20,40	21,00	15,30	9,27	22,00
	15	9,54	9,18	10,60	76,30	-	23,90	13,80	10,90	23,30
	20	11,20	10,40	10,60	36,70	-	11,30	17,20	10,90	26,10
	25	11,40	11,60	8,44	31,80	20,00	21,00	16,00	11,00	22,90
	30	9,21	9,22	8,18	30,00	20,50	21,40	20,70	10,60	23,40
	35	11,40	12,40	9,19	27,70	28,40	23,00	8,42	10,80	23,60
	40	11,50	11,90	10,20	17,50	22,90	24,30	33,60	10,10	23,50
	MW	11,00	11,00	10,10	29,40	22,80	21,10	17,90	10,40	22,20
	SEM	0,47	0,52	0,48	6,55	1,04	1,30	2,36	0,23	1,51
Jejunum										
Länge des Segments [cm]		6,20	7,00	5,00	6,20	7,00	5,00	6,20	7,00	5,00
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	-	-	-	18,60	14,90	15,00	13,50	3,17	18,40
	5	-	5,57	6,85	15,30	17,20	14,80	7,39	5,19	18,10
	10	6,65	4,94	5,71	18,70	13,60	16,60	12,20	4,56	16,90
	15	7,88	4,79	5,17	18,70	16,40	14,40	10,40	6,83	17,20
	20	7,78	7,94	5,67	20,50	17,70	15,60	12,40	4,45	18,20
	25	6,85	5,81	4,76	18,80	18,60	17,90	12,50	4,27	15,40
	30	2,64	7,70	5,45	8,23	16,60	18,10	10,90	5,18	17,10
	35	7,24	6,67	5,75	18,90	14,90	17,00	12,20	11,10	15,80
	40	7,76	6,12	4,69	15,00	10,80	14,90	11,90	6,94	15,60
	MW	6,69	6,19	5,51	15,60	17,00	16,00	11,50	5,74	17,00
	SEM	0,65	0,42	0,24	0,79	1,24	0,47	0,59	0,78	0,39
Gewicht der Ratte [g]										
		335	356	266	335	356	266	335	356	266

B.3.A.I.b Permeabilitäten in der Aktivitätsphase: Intestinale Permeabilitäten von Losartan (initial: 0,01 mM Losartan-Perfusatkonzentration) bei Perfusionen in der Nacht ohne und mit verschiedenen P-GP-Inhibitoren (Perfusatkonzentrationen: 0,5 mM Verapamil (VERA); 0,01 mM EXP 3174 (EXP) und 0,02 mM PSC 833 (PSC))

	Zeit [min]	Losartan			Losartan + Vinblastin			Losartan +		
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	VERA	EXP	PSC
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Ileum										
Länge des Segments [cm]		3,00	5,20	2,00	3,00	5,20	2,00	3,00	5,20	2,00
P_{eff} [10^{-5} cm/sec]	0	-	-	-	20,30	18,00	19,30	11,10	7,67	22,00
	5	19,80	7,83	10,00	21,40	19,20	18,10	14,30	8,38	22,30
	10	7,74	8,38	7,35	19,60	17,80	19,20	13,90	9,43	22,60
	15	5,06	8,20	8,00	15,90	18,90	19,80	12,50	8,48	21,70
	20	5,75	6,68	8,15	17,10	17,90	18,60	9,48	8,96	21,60
	25	7,27	7,22	8,53	21,00	19,40	18,90	11,20	8,13	21,60
	30	6,81	8,25	8,01	20,40	18,60	18,40	13,90	8,07	21,50
	35	7,52	9,02	6,99	19,70	17,80	18,60	14,80	8,00	19,70
	40	7,23	8,50	7,97	19,50	19,50	20,20	11,70	8,10	23,40
	MW	8,39	8,01	8,13	19,40	18,60	19,00	12,50	8,36	21,80
	SEM	1,66	0,26	0,32	0,61	0,23	0,23	0,60	0,18	0,34
Jejunum										
Länge des Segments [cm]		4,80	5,40	4,20	4,80	5,40	4,20	4,80	5,40	4,20
P_{eff} [10^{-5} cm/sec]	0	-	-	-	13,40	15,50	14,50	8,86	2,44	14,20
	5	4,72	6,30	4,09	13,40	14,80	16,50	11,10	3,12	13,60
	10	3,42	2,57	3,04	13,20	15,00	14,10	5,60	3,13	15,50
	15	2,65	2,28	3,22	14,40	15,70	13,60	6,26	5,00	15,10
	20	3,27	3,46	3,54	14,30	14,80	13,30	9,22	3,07	14,30
	25	2,188	4,71	2,69	14,60	16,00	13,80	10,60	2,86	15,80
	30	2,78	5,04	4,41	13,90	13,00	15,00	9,43	3,48	16,10
	35	3,61	3,30	4,31	14,00	15,40	13,90	8,46	3,85	16,20
	40	3,19	4,19	3,34	14,00	-	14,60	8,27	3,90	16,20
	MW	3,23	3,98	3,58	13,90	15,00	14,40	8,65	3,43	15,20
	SEM	0,27	0,48	0,22	0,16	0,31	0,32	0,61	0,25	0,32
Gewicht der Ratte [g]										
		418	349	302	418	349	302	418	349	302

B.3.B. Untersuchungen mit dem P-GP-Modellsubstrat Talinolol**B.3.B.I. Tageszeitlicher Einfluss auf die effektive intestinale Permeabilität**

B.3.B.I.a Permeabilitäten in der Ruhephase: Intestinale Permeabilitäten von Talinolol (initial: 0,01 mM Talinolol-Perfusatkonzentration) bei Perfusionen am Tag ohne und mit verschiedenen P-GP-Inhibitoren (Perfusatkonzentrationen: 0,01 mM Vinblastin; 0,02 mM PSC 833; 0,05 mM Rifampicin)

	Zeit [min]	Talinolol		Talinolol + PSC 833		Talinolol + Vinblastin	
		S-Talinolol	R-Talinolol	S-Talinolol	R-Talinolol	S-Talinolol	R-Talinolol
Ileum							
Länge des Segments [cm]		5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	22,90	19,10	27,00	27,20	39,20	38,90
	5	20,50	22,30	26,20	28,30	36,00	41,40
	10	22,40	20,10	27,70	28,50	43,20	40,60
	15	18,80	22,20	25,80	27,60	37,30	37,00
	20	21,70	20,60	26,80	28,90	41,10	38,60
	25	19,80	20,70	28,70	27,30	39,70	37,40
	30	21,30	23,40	28,30	28,00	37,70	41,90
	35	19,30	19,70	24,60	28,70	39,20	38,60
	40	18,10	21,90	26,00	24,30	36,40	41,10
	MW	20,50	21,10	26,80	27,60	38,90	39,50
	SEM	0,58	0,50	0,44	0,47	0,78	0,60
Jejunum 1							
	Zeit [min]	Talinolol		Talinolol + Rifampicin		Talinolol + Vinblastin	
		S-Talinolol	R-Talinolol	S-Talinolol	R-Talinolol	S-Talinolol	R-Talinolol
Länge des Segments [cm]		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	20,90	20,90	23,80	23,80	41,70	43,40
	5	21,10	20,50	22,90	23,90	42,20	42,00
	10	20,80	19,90	23,90	22,80	40,80	41,70
	15	23,50	21,80	22,40	23,50	36,70	40,80
	20	19,90	22,80	23,40	23,50	-	-
	25	19,60	20,90	23,80	24,10	39,80	41,50
	30	20,20	20,90	21,50	23,70	41,50	44,60
	35	15,90	19,30	22,90	26,10	41,20	40,90
	40	21,90	20,60	24,20	23,30	41,30	43,60
	MW	20,40	20,80	23,20	23,80	40,70	42,30
	SEM	0,69	0,34	0,29	0,31	0,61	0,49

	Zeit [min]	Talinalol		Talinalol + Losartan		Talinalol + Vinblastin	
		S-Talinalol	R-Talinalol	S-Talinalol	R-Talinalol	S-Talinalol	R-Talinalol
Jejunum 2							
Länge des Segments [cm]		4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	19,90	20,00	26,40	27,10	39,90	41,20
	5	20,70	20,30	24,00	23,10	40,00	37,70
	10	20,10	20,70	-	-	40,40	37,20
	15	20,90	21,50	26,00	23,60	42,80	40,70
	20	19,10	18,90	23,60	22,90	40,40	38,60
	25	19,50	22,80	24,70	23,20	40,80	39,90
	30	22,40	20,60	23,60	22,70	40,70	40,30
	35	17,20	17,20	25,10	21,50	41,10	41,20
	40	10,40	15,90	26,50	21,90	41,50	40,80
	MW	18,90	19,70	25,00	23,20	40,80	39,70
	SEM	1,17	0,71	0,43	0,59	0,30	0,50
Gewicht der Ratte [g]		302	302	302	302	302	302

B.3.B.I.b Permeabilitäten in der Aktivitätsphase: Intestinale Permeabilitäten von Talinalol (initial: 0,01 mM Talinalol-Perfusatkonzentration) bei Perfusionen in der Nacht ohne und mit verschiedenen P-GP-Inhibitoren (Perfusatkonzentrationen: 0,01 mM Vinblastin; 0,02 mM PSC 833; 0,05 mM Rifampicin)

	Zeit [min]	Talinalol		Talinalol + PSC 833		Talinalol + Vinblastin	
		S-Talinalol	R-Talinalol	S-Talinalol	R-Talinalol	S-Talinalol	R-Talinalol
Ileum							
Länge des Segments [cm]		3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]	0	15,50	13,80	24,10	24,90	33,30	31,50
	5	14,70	13,80	23,90	23,30	31,30	32,30
	10	14,60	13,50	23,70	22,50	31,00	31,20
	15	15,10	14,50	23,20	23,80	32,40	32,20
	20	14,00	14,30	23,70	23,30	31,60	31,90
	25	14,50	14,00	24,00	24,10	33,10	31,80
	30	14,10	12,40	22,60	24,10	32,20	32,10
	35	14,90	14,80	23,70	23,50	31,70	31,30
	40	13,50	14,00	24,00	24,70	30,50	31,40
	MW	14,50	13,90	23,60	23,80	31,90	31,80
	SEM	0,22	0,25	0,16	0,25	0,31	0,14

		Talinolol		Talinolol + Rifampicin		Talinolol + Vinblastin	
	Zeit [min]	S-Talinolol	R-Talinolol	S-Talinolol	R-Talinolol	S-Talinolol	R-Talinolol
Jejunum 1							
Länge des Segments [cm]		5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]							
	0	14,20	15,60	18,10	18,10	32,20	33,00
	5	13,90	15,70	18,70	18,20	-	-
	10	13,40	15,90	18,90	17,90	31,70	33,10
	15	13,80	15,20	18,70	18,80	32,10	31,60
	20	14,10	15,40	18,10	18,80	32,00	32,80
	25	13,10	14,10	18,30	18,00	31,70	32,20
	30	14,00	14,80	18,00	18,40	30,50	31,70
	35	14,40	15,30	18,10	18,10	31,50	31,20
	40	14,90	14,00	18,30	18,60	31,60	31,70
	MW	14,00	15,10	18,40	18,30	31,60	32,20
	SEM	0,18	0,22	0,12	0,12	0,19	0,26
Jejunum 2							
		Talinolol		Talinolol + Losartan		Talinolol + Vinblastin	
Länge des Segments [cm]		3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
P_{eff} [10⁻⁵ cm/sec]							
	0	14,00	14,90	21,00	21,40	32,80	32,50
	5	13,80	14,40	22,10	20,10	33,90	32,80
	10	14,40	13,90	21,90	20,40	32,70	32,50
	15	15,10	17,30	21,00	19,40	32,80	31,40
	20	14,50	14,80	22,30	21,80	33,50	31,00
	25	15,00	14,60	22,40	21,70	31,80	31,70
	30	13,90	14,40	20,60	22,90	32,50	31,60
	35	14,00	15,10	20,30	20,30	32,90	32,80
	40	15,50	14,00	21,60	21,20	33,10	32,90
	MW	14,50	14,80	21,50	21,00	32,90	32,10
	SEM	0,19	0,34	0,25	0,36	0,20	0,23
Gewicht der Ratte [g]		331	331	331	331	331	331

C. Rohdaten der In-vivo-Studien

C.1. Pharmakokinetische Untersuchungen

C.1.A. Losartanstudie – Individuelle Kinetik und Gallekinetik von Losartan und EXP 3174 bei Ratten

C.1.A.I. Rattengewichte [g] bei intravenöser (i.v.: 3 mg/kg KG) und peroraler (p.o.: 10 mg/kg KG) Applikation von Losartan

Losartanstudie				
Probenart	Ratten Nr.	Gewicht in [g] nach i.v.-Applikation	Ratten Nr	Gewicht in [g] nach p.o.-Applikation
Blut	1	280	7	296
Blut	2	324	8	300
Blut	3	328	9	302
Blut und Galle	4	312	10	301
Blut und Galle	5	291	11	302
Blut und Galle	6	295	12	305

C.1.A.II. Dosen [mg] bei intravenöser (i.v.: 3 mg/kg KG) und peroraler (p.o.: 10 mg/kg KG) Applikation von Losartan

Losartanstudie				
Probenart	Ratten Nr.	i.v. applizierte Dosis [mg]	Ratten Nr	p.o. applizierte Dosis [mg]
Blut	1	0,840	7	2,96
Blut	2	0,972	8	3,00
Blut	3	0,984	9	3,02
Blut und Galle	4	0,934	10	3,01
Blut und Galle	5	0,873	11	3,02
Blut und Galle	6	0,885	12	3,05

C.1.A.III. Losartan und EXP 3174 im Blut nach Losartanapplikation

C.1.A.III.a. Individuelle Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$] im Blut von Losartan und EXP 3174 nach intravenöser Applikation von Losartan (3 mg/kg KG) – Ratten 1-6

i.v.-Losartanapplikation													
Zeit [min]	Losartankonzentration [$\mu\text{g/ml}$]						EXP 3174-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]						
	Ohne Gallengangskanülierung			Mit Gallengangskanülierung			Ohne Gallengangskanülierung			Mit Gallengangskanülierung			
	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	3,11	3,83	4,36	8,44	9,58	12,76	0,40	-	0,35	0,43	-	0,36	
20	8,03	1,81	3,96	7,17	11,77	6,22	0,75	0,52	0,88	0,64	1,47	0,82	
60	1,95	1,40	1,30	4,19	9,44	4,75	0,78	0,65	0,92	0,68	4,79	0,89	
180	1,96	0,93	0,49	2,47	5,07	2,96	1,34	0,68	0,49	0,91	1,15	1,19	
360	1,51	0,47	0,36	2,09	3,79	2,70	0,82	0,40	0,45	1,27	1,19	1,21	
480	3,99	0,41	0,33	2,94	3,47	7,27	1,87	0,58	0,61	1,97	2,74	2,37	
720	0,62	-	0,31	1,48	3,10	2,20	1,60	0,54	0,35	2,31	4,79	1,99	
1440	0,31	-	0,52	0,88	1,45	1,47	0,73	-	0,57	1,17	4,57	3,38	

C.1.A.III.b. Mittlere Blutspiegel [$\mu\text{g/ml}$] von Losartan und EXP 3174 nach intravenöser Applikation von Losartan (3 mg/kg KG), n = 6 Ratten für jeden Zeitpunkt

i.v.-Losartanapplikation												
Zeit [min]	Losartankonzentrationen [$\mu\text{g/ml}$]						EXP 3174-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]					
	Gesamt		Ohne Gallengangs- kanülierung		Mit Gallengangs- kanülierung		Gesamt		Ohne Gallengangs- kanülierung		Mit Gallengangs- kanülierung	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	7,01	1,57	3,77	0,36	10,26	1,29	0,26	0,08	0,25	0,13	0,27	0,13
20	6,50	1,40	4,60	1,82	8,39	1,71	0,85	0,14	0,72	0,11	0,98	0,25
60	3,84	1,27	1,55	0,20	6,12	1,66	1,45	0,67	0,78	0,08	2,12	1,34
180	2,31	0,67	1,13	0,44	3,50	0,80	0,96	0,13	0,84	0,26	1,08	0,09
360	1,82	0,54	0,78	0,37	2,86	0,50	0,89	0,16	0,56	0,13	1,22	0,03
480	3,07	1,05	1,58	1,21	4,56	1,36	1,69	0,37	1,02	0,43	2,36	0,22
720	1,54	0,49	0,31	0,18	2,26	0,47	2,10	0,68	0,83	0,39	3,37	0,74
1440	0,93	0,25	0,28	0,15	1,27	0,19	2,08	0,74	0,43	0,22	3,04	0,99

C.1.A.III.c. Pharmakokinetische Parameter der Blut-Konzentrations-Zeit-Profile von Losartan und EXP 3174 nach intravenöser Applikation von Losartan (3 mg/kg KG), n = 6 Ratten für jeden Zeitpunkt – Ratten 1-6

i.v.-Losartanapplikation												
Pharmakokinetische Parameter	Ohne Gallengangskanülierung			Mit Gallengangskanülierung			Gesamt		Ohne Gallengangskanülierung		Mit Gallengangskanülierung	
	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
Losartan												
$t_{1/2}$ [min]	481,01	246,33	365,67	683,93	596,77	803,84	529,59	84,26	364,34	67,75	694,85	60,02
λ [min^{-1}]	$1,44 \cdot 10^{-3}$	$2,81 \cdot 10^{-3}$	$1,90 \cdot 10^{-3}$	$1,01 \cdot 10^{-3}$	$1,16 \cdot 10^{-3}$	$0,86 \cdot 10^{-3}$	$1,53 \cdot 10^{-3}$	$0,29 \cdot 10^{-3}$	$2,05 \cdot 10^{-3}$	$0,40 \cdot 10^{-3}$	$1,01 \cdot 10^{-3}$	$0,08 \cdot 10^{-3}$
$AUC_{0-\infty}$ [$\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$]	2256,69	875,00	822,79	3706,79	6298,74	5978,57	3323,10	990,54	1318,16	469,51	5328,03	815,87
CL_{tot} [ml/min]	1,33	3,43	3,65	0,81	0,48	0,50	1,70	0,60	2,80	0,74	0,60	0,11
Quotient $AUC_{\text{EXP}}/AUC_{\text{Los}}$	1,11	1,99	1,31	1,14	0,92	-	1,29	0,17	1,47	0,26	1,03	0,09
V_d [l]	0,92	1,22	1,92	0,80	0,41	0,58	0,98	0,22	1,35	0,30	0,60	0,11
F [%]	18,24	35,88	10,27	48,43	45,72	38,61	32,86	6,25	21,46	7,57	44,25	2,93
EXP 3174												
$t_{1/2}$ [min]	689,54	1607,74	1093,62	1090,68	521,19	-	1000,55	172,24	1130,30	265,70	805,94	232,49
λ [min^{-1}]	$1,01 \cdot 10^{-3}$	$0,43 \cdot 10^{-3}$	$0,63 \cdot 10^{-3}$	$0,64 \cdot 10^{-3}$	$1,33 \cdot 10^{-3}$	-	$0,81 \cdot 10^{-3}$	$0,15 \cdot 10^{-3}$	$0,69 \cdot 10^{-3}$	$0,17 \cdot 10^{-3}$	$0,98 \cdot 10^{-3}$	$0,28 \cdot 10^{-3}$
$AUC_{0-\infty}$ [$\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$]	2514,24	1739,59	1077,64	4213,66	5788,70	-	3066,77	783,89	1777,16	415,14	5001,18	643,01

C.1.A.III.d. Individuelle Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$] im Blut von Losartan und EXP 3174 nach peroraler Applikation (10 mg/kg KG) von Losartan – Ratten 7-12

p.o.-Losartanapplikation												
		Losartankonzentration [$\mu\text{g/ml}$]						EXP 3174-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]				
Zeit [min]	Ohne Gallengangskanülierung			Mit Gallengangskanülierung			Ohne Gallengangskanülierung			Mit Gallengangskanülierung		
	Ratte 7	Ratte 8	Ratte 9	Ratte 10	Ratte 11	Ratte 12	Ratte 7	Ratte 8	Ratte 9	Ratte 10	Ratte 11	Ratte 12
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	3,89	1,52	8,26	5,85	8,80	10,81	0,47	-	1,34	0,32	-	2,69
60	1,17	0,86	8,01	5,78	8,46	9,24	0,53	0,42	5,59	0,74	0,84	0,83
180	0,85	0,76	2,59	2,88	8,08	5,38	0,73	0,63	3,29	0,96	3,99	0,72
360	2,90	0,38	2,32	1,69	2,13	5,08	0,97	0,43	3,11	0,57	2,84	0,55
480	-	0,47	0,95	1,51	1,79	2,75	-	0,55	1,03	0,52	2,43	0,62
720	-	0,35	0,90	0,85	1,01	2,39	-	0,35	0,48	0,35	1,97	0,60
1440	-	-	0,40	0,39	0,60	0,72	-	-	-	0,32	0,85	0,53

C.1.A.III.e. Mittlere Blutspiegel [$\mu\text{g/ml}$] von Losartan und EXP 3174 nach peroraler Applikation (10 mg/kg KG) von Losartan, n = 6 Ratten für jeden Zeitpunkt

p.o.-Losartanapplikation												
		Losartankonzentrationen [$\mu\text{g/ml}$]						EXP 3174-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]				
Zeit [min]	Gesamt		Ohne Gallengangs- kanülierung		Mit Gallengangs- kanülierung		Gesamt		Ohne Gallengangs- kanülierung		Mit Gallengangs- kanülierung	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	6,52	1,40	4,56	1,97	8,49	1,44	1,20	0,43	0,60	0,39	1,00	0,85
60	5,59	1,52	3,35	2,33	7,83	1,05	1,49	0,82	2,18	1,70	0,81	0,03
180	3,42	1,16	1,40	0,59	5,44	1,50	1,72	0,62	1,55	0,87	1,89	1,05
360	2,42	0,63	1,87	0,76	2,97	1,06	1,41	0,50	1,50	0,82	1,32	0,76
480	1,49	0,40	0,47	0,27	2,02	0,37	1,19	0,38	0,79	0,53	1,19	0,62
720	1,10	0,33	0,42	0,26	1,42	0,49	0,94	0,31	0,59	0,42	0,97	0,50
1440	0,53	0,12	0,13	0,13	0,57	0,10	0,54	0,13	0,16	0,16	0,56	0,15

C.1.A.III.f. Pharmakokinetische Parameter der Blut-Konzentrations-Zeit-Profile von Losartan und EXP 3174 nach peroraler Applikation von Losartan (10 mg/kg KG), n = 6 Ratten für jeden Zeitpunkt – Ratten 7-12

p.o.-Losartanapplikation													
Pharmakokinetische Parameter	Ohne Gallengangskanülierung				Mit Gallengangskanülierung			Gesamt		Ohne Gallengangskanülierung		Mit Gallengangskanülierung	
	Ratte 7	Ratte 8	Ratte 9	Ratte 10	Ratte 11	Ratte 12	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	
Losartan													
C_{max} [µg/ml]	3,89	1,52	8,26	5,85	8,80	10,81	6,52	1,40	4,56	1,97	8,49	1,44	
t_{max} [min]	20	20	20	20	20	20	20	0	20	0	20	0	
t_{1/2} [min]	574,90	688,48	474,65	456,00	604,57	426,14	537,46	41,51	579,34	61,77	495,57	55,18	
λ [min⁻¹]	1,21 · 10 ⁻³	1,01 · 10 ⁻³	1,46 · 10 ⁻³	1,52 · 10 ⁻³	1,15 · 10 ⁻³	1,63 · 10 ⁻³	1,33 · 10 ⁻³	0,10 · 10 ⁻³	1,23 · 10 ⁻³	0,73 · 10 ⁻³	1,43 · 10 ⁻³	0,15 · 10 ⁻³	
AUC_{0-∞} [µg·min/ml]	1450,78	790,13	2610,42	2375,19	3982,80	4493,56	2617,15	581,46	1617,11	532,01	3617,18	638,26	
CL_{tot} [ml/min]	6,89	12,7	3,83	4,21	2,51	2,23	5,40	1,61	7,81	2,60	2,98	0,62	
CL/F [ml/min]	68,18	125,18	37,89	41,64	24,83	22,01	53,29	15,86	77,08	25,59	29,50	6,13	
Quotient AUC_{EXP}/AUC_{LOS}	0,81	1,13	1,12	0,32	0,89	0,23	0,75	0,16	1,02	0,10	0,48	0,21	
V_d [l]	5,72	12,60	2,62	2,77	2,19	1,37	4,55	1,72	6,98	2,95	2,11	0,41	
F [%]	18,24	35,88	10,27	48,43	45,72	38,61	32,86	6,25	21,46	7,57	44,25	2,93	
EXP 3174													
C_{max} [µg/ml]	0,97	0,63	5,59	0,96	3,99	2,69	2,47	0,82	2,40	1,60	2,55	0,88	
t_{max} [min]	360	180	60	180	180	20	163,33	48,56	200,00	87,18	126,67	53,33	
t_{1/2} [min]	409,52	954,28	441,15	496,22	588,76	501,72	565,28	81,72	601,65	176,55	528,90	29,97	
λ [min⁻¹]	1,69 · 10 ⁻³	0,73 · 10 ⁻³	1,57 · 10 ⁻³	1,40 · 10 ⁻³	1,18 · 10 ⁻³	1,38 · 10 ⁻³	1,32 · 10 ⁻³	0,14 · 10 ⁻³	1,33 · 10 ⁻³	0,31 · 10 ⁻³	1,32 · 10 ⁻³	0,07 · 10 ⁻³	
AUC_{0-∞} [µg·min/ml]	1176,80	893,75	2922,85	768,15	3536,95	1018,07	1719,43	487,33	1664,47	634,48	1774,39	884,23	

C.1.A.IV. Losartan und EXP 3174 in der Galle nach Losartanapplikation

C.1.A.IV.a. Individuelle biliär ausgeschiedene Mengen [µg] von Losartan und EXP 3174 nach intravenöser Applikation von Losartan (3 mg/kg KG) – Ratten 4-6

i.v.-Losartanapplikation													
		Losartankonzentration [µg]						EXP 3174-Konzentration [µg]					
Zeit [min]	Losartan [µg]			Losartan kumulativ [µg]			EXP 3174 [µg]			EXP 3174 kumulativ [µg]			
	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6	
15	51,62	0,33	4,02	51,62	0,33	4,02	0,94	0,15	0,89	0,94	0,15	0,89	
45	20,98	-	4,80	72,60	-	8,82	10,85	-	5,11	11,79	-	6,00	
75	10,13	2,71	4,78	82,73	3,04	13,60	13,08	2,40	13,51	24,88	2,55	19,51	
105	9,75	0,35	0,52	92,48	3,38	14,12	1,84	0,29	1,42	26,71	2,84	20,93	
135	1,95	2,99	-	94,43	6,38	-	3,43	5,04	4,08	30,15	7,88	25,01	
165	0,79	1,15	0,36	95,22	7,52	14,48	1,11	3,53	1,24	31,26	11,42	26,25	
210	3,40	3,71	2,45	98,62	11,23	16,93	7,00	13,02	8,79	38,25	24,44	35,04	
270	0,57	1,20	0,62	99,19	12,43	17,56	0,90	5,01	2,84	39,15	29,45	37,88	
330	0,54	0,38	1,46	99,72	12,81	19,02	1,07	1,35	5,36	40,22	30,81	43,24	
390	0,39	0,28	0,22	100,11	13,09	19,24	0,65	0,64	0,57	40,86	31,44	43,82	
450	0,54	0,64	0,27	100,65	13,72	19,51	0,85	1,60	0,87	41,72	33,04	44,68	
510	0,21	0,34	0,18	100,87	14,06	19,69	0,23	0,32	0,42	41,94	33,36	45,10	
550	2,84	2,62	1,51	103,70	16,68	21,20	1,60	1,75	0,91	43,54	35,11	46,1	
1500	2,62	2,60	2,31	106,32	19,27	23,51	2,52	2,07	1,66	46,06	37,17	47,67	

C.1.A.IV.b. Individuelle biliär ausgeschiedene Mengen [μg] von Losartan und EXP 3174 nach peroraler Applikation von Losartan (10 mg/kg KG) – Ratten 10-12

p.o.-Losartanapplikation												
Zeit [min]	Losartankonzentration [μg]									EXP 3174-Konzentration [μg]		
	Losartan [μg]			Losartan kumulativ [μg]			EXP 3174 [μg]			EXP 3174 kumulativ [μg]		
	Ratte 10	Ratte 11	Ratte 12	Ratte 10	Ratte 11	Ratte 12	Ratte 10	Ratte 11	Ratte 12	Ratte 10	Ratte 11	Ratte 12
15	-	-	0,30	-	-	0,30	-	-	-	-	-	0,20
45	4,85	-	1,20	4,85	-	1,50	1,73	-	1,73	-	-	0,58
75	18,93	1,15	10,16	23,78	1,15	11,66	18,26	0,41	19,99	0,41	0,41	5,00
105	17,26	1,82	14,71	41,03	2,97	26,37	29,75	0,70	49,74	1,11	1,11	18,23
135	8,03	1,70	9,38	49,06	4,68	35,75	31,63	0,66	81,36	1,78	1,78	36,39
165	4,51	1,63	9,38	53,57	6,30	45,13	26,48	0,68	107,84	2,46	2,46	62,61
210	4,79	2,71	10,56	58,35	9,02	55,69	32,03	1,76	139,88	4,22	4,22	101,66
270	2,94	3,51	3,47	61,29	12,52	59,16	21,34	3,98	161,21	8,20	8,20	118,21
330	2,38	3,40	1,96	63,67	15,92	61,12	17,84	6,63	179,06	14,84	14,84	128,68
390	1,59	1,65	1,41	65,26	17,57	62,53	12,14	4,17	191,19	19,01	19,01	137,74
450	1,56	1,50	0,56	66,81	19,07	63,10	12,90	4,03	204,09	23,04	23,04	145,67
510	1,29	1,36	1,23	68,10	20,42	64,33	9,39	3,47	213,48	26,51	26,51	151,20
550	0,80	0,91	0,79	68,90	21,34	65,11	6,05	2,06	219,53	28,56	28,56	154,37
630	0,87	1,08	0,94	69,77	22,42	66,05	6,48	5,59	226,01	34,16	34,16	156,89
690	1,11	1,46	7,05	70,88	23,87	73,10	7,68	6,58	233,69	40,74	40,74	185,15
1065	6,68	10,46	10,66	77,56	34,33	83,75	39,98	57,16	273,67	97,90	97,90	208,56
1425	0,26	0,58	0,36	77,81	34,91	84,11	0,92	2,66	274,60	100,55	100,55	209,29
1500	1,41	2,16	1,72	79,22	37,07	85,83	4,01	10,05	278,61	110,61	110,61	212,64

C.1.A.IV.c. Mittlere biliär ausgeschiedene Mengen [µg] von Losartan und EXP 3174 nach intravenöser und peroraler Applikation (i.v.: 3 mg/kg KG; p.o.: 10 mg/kg KG) von Losartan, n = 3 Ratten je Zeitpunkt

Zeit [min]	i.v.-Losartanapplikation												p.o.-Losartanapplikation											
	Losartankonzentration [µg]						EXP 3174-Konzentration [µg]						Losartankonzentration [µg]						EXP 3174-Konzentration [µg]					
	Losartan [µg]		Losartan kumulativ [µg]		EXP 3174 [µg]		EXP 3174 kumulativ [µg]		Losartan [µg]		Losartan kumulativ [µg]		EXP 3174 [µg]		EXP 3174 kumulativ [µg]		Losartan [µg]		Losartan kumulativ [µg]		EXP 3174 [µg]		EXP 3174 kumulativ [µg]	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
15	18,66	16,52	18,66	16,52	0,66	0,26	0,66	0,26	0,30	-	0,30	-	0,30	-	0,30	-	0,20	-	0,20	-	0,20	-	0,20	-
45	8,59	6,35	27,25	22,81	5,32	3,13	5,98	3,36	3,02	1,83	3,18	1,67	1,05	0,67	1,15	0,58	7,70	5,41	8,47	5,91	14,56	23,03	14,24	23,04
75	5,87	2,21	33,12	24,99	9,66	3,63	15,65	6,73	10,08	5,13	12,20	6,54	7,70	5,41	8,47	5,91	14,56	23,03	14,24	23,04	14,56	23,03	14,24	23,04
105	3,54	3,11	36,66	28,08	1,18	0,46	16,83	7,19	11,26	4,78	11,08	11,08	11,08	11,08	11,08	14,24	14,56	23,03	14,24	23,04	14,56	23,03	14,24	23,04
135	1,65	0,88	38,31	28,15	4,19	0,47	21,01	6,73	6,37	2,37	29,83	13,15	16,82	8,96	39,84	23,04	16,82	8,96	39,84	23,04	16,82	8,96	39,84	23,04
165	0,77	0,23	39,08	28,14	1,96	0,79	22,98	5,96	5,17	2,26	35,00	14,55	17,79	8,56	57,64	30,52	17,79	8,56	57,64	30,52	17,79	8,56	57,64	30,52
210	3,18	0,38	42,26	28,23	9,60	1,79	32,58	4,17	6,02	2,35	41,02	16,02	24,28	11,44	40,38	40,38	24,28	11,44	40,38	40,38	24,28	11,44	40,38	40,38
270	0,80	0,20	43,06	28,10	2,92	1,19	35,49	3,04	3,31	0,18	44,32	15,91	33,95	5,18	45,56	45,56	13,95	5,18	95,87	45,56	13,95	5,18	95,87	45,56
330	0,79	0,34	43,85	27,99	2,59	1,39	38,09	3,74	2,58	0,43	46,90	15,51	38,09	3,74	48,57	48,57	11,65	3,29	107,53	48,57	11,65	3,29	107,53	48,57
390	0,30	0,05	44,15	28,04	0,62	0,02	38,71	3,73	1,55	0,07	48,45	15,46	38,71	3,73	50,88	50,88	8,46	2,32	115,98	50,88	8,46	2,32	115,98	50,88
450	0,48	0,11	44,63	28,06	1,11	0,24	39,81	3,49	1,21	0,32	49,66	15,33	39,81	3,49	53,35	53,35	8,28	2,57	124,26	53,35	8,28	2,57	124,26	53,35
510	0,24	0,05	44,87	28,04	0,32	0,05	40,14	3,51	1,29	0,04	50,95	15,30	40,14	3,51	54,97	54,97	6,13	1,74	130,40	54,97	6,13	1,74	130,40	54,97
550	2,32	0,41	47,19	28,24	1,42	0,26	41,55	3,30	0,83	0,04	51,78	15,26	41,55	3,30	56,05	56,05	3,76	1,19	134,16	56,05	3,76	1,19	134,16	56,05
630	-	-	-	-	-	-	-	-	0,96	0,06	52,75	15,20	-	-	56,10	56,10	4,86	1,20	139,02	56,10	4,86	1,20	139,02	56,10
690	-	-	-	-	-	-	-	-	3,20	1,92	55,95	16,05	-	-	57,95	57,95	14,18	7,05	153,20	57,95	14,18	7,05	153,20	57,95
1065	-	-	-	-	-	-	-	-	9,26	1,29	65,21	15,55	-	-	51,31	51,31	40,18	9,74	193,38	51,31	40,18	9,74	193,38	51,31
1425	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	0,09	65,61	15,46	-	-	50,76	50,76	1,44	0,61	194,81	50,76	1,44	0,61	194,81	50,76
1500	2,51	0,10	49,70	28,34	2,08	0,25	43,63	3,26	1,76	0,22	67,37	15,27	43,63	3,26	48,87	48,87	5,81	2,13	200,62	48,87	5,81	2,13	200,62	48,87

C.1.A.IV.d. Pharmakokinetische Parameter der Galle-Konzentrations-Zeit-Profile von Losartan und EXP 3174 nach intravenöser und peroraler Applikation (i.v.: 3 mg/kg KG; p.o.: 10 mg/kg KG) von Losartan, n = 3 Ratten für jeden Zeitpunkt – Ratten 10-12

Pharmakokinetische Parameter	i.v.-Losartanapplikation					p.o.-Losartanapplikation						
	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6	MW	SEM	Ratte 10	Ratte 11	Ratte 12	MW	SEM		
Losartan												
Gallefluss [µl/min]	1,94	2,21	2,27	2,14	0,10	5,07	5,25	4,54	4,95	0,21		
C_{max} [µg/ml]	-	-	-	-	-	5,85	8,80	10,81	8,49	1,44		
t_{max} [min]	-	-	-	-	-	20	20	20	20	0		
CL_{bil} [ml/min]	0,07	0,20	0,18	0,15	0,0	-	-	-	-	-		
t_{1/2} [min]	395,27	401,44	416,44	404,38	6,29	285,79	307,00	259,72	284,17	13,67		
Ausgeschiedene Menge Ae_{0-1560min} [µg]	107	21,20	24,40	50,87	28,08	81,20	41,10	88,60	70,30	14,76		
Quotient Ae (EXP 3174)/Ae (LOS)	0,43	1,78	1,96	1,39	0,48	3,49	2,85	2,45	2,93	0,30		
EXP 3174												
C_{max} [µg/ml]	-	-	-	-	-	0,96	3,99	2,69	2,55	0,88		
t_{max} [min]	-	-	-	-	-	180	180	20	126,67	53,33		
t_{1/2} [min]	391,13	395,52	360,31	382,32	11,08	215,64	289,27	213,31	239,41	24,94		
Ausgeschiedene Menge Ae_{0-1560min} [µg]	46,40	37,70	47,90	44,00	3,18	283,00	117,00	217,00	205,67	48,25		

C.1.B. EXP 3174-Studie – Individuelle Kinetik und Gallekinetik von EXP 3174 bei Ratten

C.1.B.I. Rattengewichte [g] bei intravenöser (i.v.: 3 mg/kg KG) und peroraler (p.o.: 10 mg/kg KG) Applikation von EXP 3174

EXP 3174-Studie				
Probenart	Ratten Nr.	Gewicht in [g] nach i.v.-Applikation	Ratten Nr	Gewicht in [g] nach p.o.-Applikation
Blut	13	311	19	282
Blut	14	296	20	292
Blut	15	295	21	296
Blut und Galle	16	281	22	286
Blut und Galle	17	308	23	287
Blut und Galle	18	320	24	289

C.1.B.II. Dosen [mg] bei intravenöser (i.v.: 3 mg/kg KG) und peroraler (p.o.: 10 mg/kg KG) Applikation von EXP 3174

EXP 3174-Studie				
Probenart	Ratten Nr.	i.v. applizierte Dosis [mg]	Ratten Nr	p.o. applizierte Dosis [mg]
Blut	1	0,933	7	2,82
Blut	2	0,888	8	2,92
Blut	3	0,885	9	2,96
Blut und Galle	4	0,843	10	2,86
Blut und Galle	5	0,924	11	2,87
Blut und Galle	6	0,960	12	2,89

C.1.B.III. EXP 3174 im Blut nach EXP 3174-Applikation

C.1.B.III.a. Individuelle Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$] im Blut von EXP 3174 nach intravenöser und peroraler Applikation (i.v.: 3 mg/kg KG; p.o.:10 mg/kg KG) von EXP 3174 – Ratten 13-24

EXP 3174-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]													
Zeit [min]	i.v.-EXP 3174-Applikation						p.o.-EXP 3174-Applikation						
	Ohne Gallengangskanülierung			Mit Gallengangskanülierung			Ohne Gallengangskanülierung			Mit Gallengangskanülierung			
	Ratte 13	Ratte 14	Ratte 15	Ratte 16	Ratte 17	Ratte 18	Ratte 19	Ratte 20	Ratte 21	Ratte 22	Ratte 23	Ratte 24	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	17,28	7,80	9,46	3,95	10,93	5,23	-	-	-	-	-	-	
20	5,93	1,44	4,44	4,54	1,83	1,40	0,21	0,30	0,23	0,73	0,26	0,38	
60	2,11	1,20	1,43	1,14	0,85	0,57	0,21	0,15	0,27	0,34	0,16	0,68	
180	0,44	0,25	0,27	1,10	0,42	0,34	0,17	0,24	0,17	0,22	0,20	0,30	
360	0,24	0,08	0,28	0,51	0,24	0,35	0,14	0,16	0,16	0,18	0,19	0,22	
480	0,16	0,06	-	0,35	0,54	0,30	0,39	-	-	0,18	0,18	0,26	
720	0,04	0,06	-	0,99	0,20	0,29	-	-	-	-	-	-	
1440	-	-	-	0,44	0,24	0,14	0,32	0,08	-	0,03	0,14	0,34	

C.1.B.III.b. Mittlere Blutspiegel [$\mu\text{g/ml}$] von EXP 3174 nach intravenöser und peroraler Applikation (i.v.: 3 mg/kg KG; p.o.: 10 mg/kg KG) von EXP 3174, n = 6 Ratten für jeden Zeitpunkt

EXP 3174-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]													
Zeit [min]	i.v.-EXP 3174-Applikation						p.o.-EXP 3174-Applikation						
	Gesamt		Ohne Gallengangs- kanülierung		Mit Gallengangs- kanülierung		Gesamt		Ohne Gallengangs- kanülierung		Mit Gallengangs- kanülierung		
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9,11	1,95	11,51	2,92	6,70	2,15	-	-	-	-	-	-	-
20	3,26	0,80	3,94	1,32	2,59	0,98	0,35	0,08	0,25	0,03	0,46	0,14	0,14
60	1,22	0,22	1,58	0,28	0,85	0,17	0,30	0,08	0,21	0,03	0,39	0,15	0,15
180	0,47	0,13	0,32	0,06	0,62	0,24	0,22	0,02	0,19	0,02	0,24	0,03	0,03
360	0,28	0,06	0,20	0,06	0,37	0,08	0,17	0,01	0,15	0,01	0,20	0,01	0,01
480	0,24	0,08	0,07	0,05	0,40	0,07	0,17	0,06	0,13	0,13	0,21	0,02	0,02
720	0,26	0,15	0,03	0,02	0,49	0,25	-	-	-	-	-	-	-
1440	0,14	0,07	-	-	0,27	0,09	0,15	0,06	0,13	0,10	0,17	0,09	0,09

C.1.B.III.c. Pharmakokinetische Parameter der Blut-Konzentrations-Zeit-Profile von EXP 3174 nach intravenöser und peroraler Applikation (i.v.: 3 mg/kg KG; p.o.: 10 mg/kg KG) von EXP 3174, n = 6 Ratten für jeden Zeitpunkt – Ratten 13-24

Pharmakokinetische Parameter	Ohne Gallengangskanülierung				Mit Gallengangskanülierung			Gesamt		Ohne Gallengangskanülierung		Mit Gallengangskanülierung	
	Ratte 13	Ratte 14	Ratte 15	Ratte 16	Ratte 17	Ratte 18	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	
i.v.-EXP 3174-Applikation													
$t_{1/2}$ [min]	149,39	159,61	149,59	227,95	148,70	384,61	203,31	38,37	152,86	3,37	253,76	69,32	
λ [min^{-1}]	$4,64 \cdot 10^{-3}$	$4,34 \cdot 10^{-3}$	$4,63 \cdot 10^{-3}$	$3,04 \cdot 10^{-3}$	$4,66 \cdot 10^{-3}$	$1,80 \cdot 10^{-3}$	$3,85 \cdot 10^{-3}$	$0,48 \cdot 10^{-3}$	$4,54 \cdot 10^{-3}$	$0,09 \cdot 10^{-3}$	$3,17 \cdot 10^{-3}$	$0,83 \cdot 10^{-3}$	
$AUC_{0-\infty}$ [$\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$]	653,36	303,15	457,29	1249,33	525,11	506,93	615,86	134,87	471,27	101,34	760,46	244,49	
CL_{tot} [ml/min]	4,59	9,90	6,56	2,40	5,71	5,92	5,85	1,01	7,02	1,55	4,68	1,14	
V_b [l]	0,99	2,28	1,42	0,79	1,23	3,28	1,67	0,39	1,56	0,38	1,77	0,77	
F [%]	22,73	18,23	11,33	7,84	28,10	25,74	19,00	3,30	17,43	3,31	20,56	6,40	
p.o.-EXP 3174-Applikation													
	Ratte 19	Ratte 20	Ratte 21	Ratte 22	Ratte 23	Ratte 24	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	
C_{max} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0,21	0,30	0,23	0,73	0,26	0,68	0,40	0,10	0,25	0,03	0,56	0,15	
t_{max} [min]	20	20	20	20	20	60	26,67	6,67	20,00	0	33,33	13,33	
$t_{1/2}$ [min]	410,50	223,29	410,89	370,75	1386,31	363,65	527,57	174,05	348,23	62,47	706,90	339,71	
λ [min^{-1}]	$1,69 \cdot 10^{-3}$	$3,10 \cdot 10^{-3}$	$1,69 \cdot 10^{-3}$	$1,87 \cdot 10^{-3}$	$0,50 \cdot 10^{-3}$	$1,91 \cdot 10^{-3}$	$1,79 \cdot 10^{-3}$	$0,34 \cdot 10^{-3}$	$2,16 \cdot 10^{-3}$	$0,47 \cdot 10^{-3}$	$1,43 \cdot 10^{-3}$	$0,46 \cdot 10^{-3}$	
$AUC_{0-\infty}$ [$\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$]	448,86	181,68	173,30	332,39	458,29	392,87	331,23	51,99	267,95	90,49	394,52	36,35	
CL_{tot} [ml/min]	22,30	55,00	57,70	30,10	21,80	25,50	35,40	6,74	45,00	11,38	25,80	2,40	
CL/F [ml/min]	122,33	302,23	316,85	165,20	119,81	139,77	194,37	37,07	247,14	62,55	141,59	13,13	
V_b [l]	13,20	17,7	34,20	16,10	43,60	13,40	23,03	5,21	21,70	6,38	24,37	9,65	
F [%]	22,73	18,23	11,33	7,84	28,10	25,74	19,00	3,30	17,43	3,31	20,56	6,40	

C.1.B.IV. EXP 3174 in der Galle nach EXP 3174-Applikation

C.1.B.IV.a. Individuelle biliär ausgeschiedene Mengen [µg] von EXP 3174 nach intravenöser und peroraler Applikation (i.v.: 3 mg/kg KG; p.o.: 10 mg/kg KG) von EXP 3174 – Ratten 16-18 und Ratten 22-24

EXP 3174-Konzentration [µg]												
EXP 3174-Konzentration [µg]												
Zeit [min]	i.v.-EXP 3174-Applikation						p.o.-EXP 3174-Applikation					
	EXP 3174 [µg]			EXP 3174 kumulativ [µg]			EXP 3174 [µg]			EXP 3174 kumulativ [µg]		
	Ratte 16	Ratte 17	Ratte 18	Ratte 16	Ratte 17	Ratte 18	Ratte 22	Ratte 23	Ratte 24	Ratte 22	Ratte 23	Ratte 24
15	-	63,62	43,67	-	63,62	43,67	0,20	-	0,02	0,20	-	0,02
45	27,04	118,58	108,79	27,04	182,20	152,45	1,92	0,73	0,77	2,12	0,73	0,79
75	-	40,71	55,41	-	222,92	207,86	4,92	2,77	1,43	7,05	3,49	2,22
105	-	19,10	38,49	-	242,02	246,35	6,83	1,64	2,86	13,87	5,13	5,08
135	10,55	16,00	18,68	37,59	258,02	265,03	10,52	1,85	4,28	24,39	6,99	9,36
165	3,88	12,48	1,41	41,46	270,50	266,44	7,36	2,07	3,88	31,76	9,06	13,23
210	26,77	18,35	17,45	68,23	288,85	283,89	16,02	5,36	10,24	47,78	14,41	23,47
270	16,66	13,75	10,89	84,89	302,60	294,78	8,59	2,80	9,00	56,37	17,21	32,47
330	14,10	8,97	9,11	98,99	311,56	303,89	9,67	1,75	6,24	66,04	18,96	38,72
390	13,79	15,16	7,70	112,78	326,72	311,59	7,18	1,33	3,76	73,22	20,29	42,47
450	4,57	3,47	4,17	117,35	330,19	315,76	3,22	1,95	1,50	76,44	22,24	43,98
600	86,99	12,95	13,51	204,34	343,14	329,27	-	-	-	-	-	-
1080	-	37,69	28,40	-	380,84	357,67	41,88	11,96	24,13	118,32	34,21	68,11
1500	4,53	2,04	1,93	208,88	382,88	359,60	7,52	1,09	2,84	125,84	35,30	70,95

C.1.B.IV.b. Mittlere biliär ausgeschiedene Mengen [μg] von EXP 3174 nach intravenöser und peroraler Applikation (i.v.: 3 mg/kg KG; p.o.: 10 mg/kg KG) von EXP 3174, n = 3 Ratten je Zeitpunkt

EXP 3174-Konzentration [μg]								
Zeit [min]	i.v.-EXP 3174-Applikation				p.o.-EXP 3174-Applikation			
	EXP 3174 [μg]		EXP 3174 kumulativ [μg]		EXP 3174 [μg]		EXP 3174 kumulativ [μg]	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
15	35,75	18,79	35,76	18,79	0,32	0,21	0,32	0,21
45	84,80	29,02	120,56	47,55	1,82	0,58	2,14	0,78
75	32,04	16,57	152,61	62,93	2,67	1,13	4,80	1,40
105	19,20	11,11	171,80	72,39	3,85	1,52	8,65	2,67
135	15,08	2,39	186,88	74,67	5,62	2,53	14,27	5,06
165	5,92	3,35	192,80	75,68	5,53	1,01	19,80	5,99
210	20,86	2,97	213,66	72,73	9,69	3,83	29,49	9,32
270	13,77	1,67	227,42	71,30	6,45	2,35	35,93	10,94
330	10,73	1,69	238,15	69,61	5,75	2,42	41,68	13,29
390	12,22	2,29	250,37	68,93	4,30	1,53	45,98	14,82
450	4,07	0,32	254,44	68,67	5,56	3,24	51,54	12,76
600	37,82	24,59	292,25	44,14	-	-	-	-
1080	22,03	11,34	314,28	55,38	22,37	11,81	73,91	24,14
1500	2,84	0,85	317,15	54,54	5,18	1,91	98,39	22,41

C.1.B.IV.c. Pharmakokinetische Parameter der Galle-Konzentrations-Zeit-Profile von EXP 3174 nach intravenöser und peroraler Applikation (i.v.: 3 mg/kg KG; p.o.: 10 mg/kg KG) von EXP 3174, n = 3 Ratten für jeden Zeitpunkt – Ratten 16-18 und Ratten 22-24

Pharmakokinetische Parameter	i.v.-EXP 3174-Applikation					p.o.-EXP 3174-Applikation				
	Ratte 16	Ratte 17	Ratte 18	MW	SEM	Ratte 22	Ratte 23	Ratte 24	MW	SEM
Gallefluss [$\mu\text{l}/\text{min}$]	4,23	6,91	7,23	6,12	0,95	4,48	4,38	4,77	4,54	0,12
C_{max} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	-	-	-	-	-	0,73	0,26	0,68	0,56	0,15
t_{max} [min]	-	-	-	-	-	20	20	60	33,33	13,33
CL_{bil} [ml/min]	0,10	0,14	0,16	0,13	0,02	-	-	-	-	-
$t_{1/2}$ [min]	325,37	258,03	267,98	283,79	20,99	280,51	280,51	245,73	268,92	11,59
Ausgeschiedene Menge $Ae_{0-1560 \text{ min}}$ [μg]	209,00	384,00	361,00	318,00	54,90	130,00	35,70	72,10	79,27	27,46

C.2. Verteilungsstudien**C.2.A. Einfluss der Comedikation mit Verapamil auf die Kinetik von Losartan und EXP 3174****C.2.A.I. Intravenöse Applikation von Losartan (3 mg/kg KG)****C.2.A.I.a. Rattengewichte [g] bei intravenöser Applikation von Losartan**

Losartanstudie: i.v.-Applikation								
	Rattengewichte in [g]							
	Ohne Verapamil				Mit Verapamil			
Zeit [min]	60	120	240	360	60	120	240	360
Tag 1	203	201	211	205	215	203	215	206
Tag 2	205	219	206	207	200	215	201	201
Tag 3	219	234	210	212	210	203	209	203

C.2.A.I.b. Organgewichte [g] bei intravenöser Applikation von Losartan

Losartanstudie: i.v.-Applikation								
	Organgewichte in [g]							
	Ohne Verapamil				Mit Verapamil			
Zeit [min]	60	120	240	360	60	120	240	360
Tag 1								
Ileum	0,49	0,82	0,77	0,82	0,62	0,47	0,94	0,60
Jejunum	0,92	1,42	2,44	2,5	1,18	1,12	2,64	2,51
Leber	8,37/1,68	7,89/1,28	8,60/1,91	8,04/1,55	8,60/2,10	8,01/1,47	8,9/2,21	8,01/2,37
Niere	2,20	2,12	2,23	2,25	1,91	1,81	2,53	1,90
Herz	0,76	0,80	0,79	0,76	0,85	0,99	0,83	0,81
Tag 2								
Ileum	0,53	0,71	0,62	0,58	0,77	0,60	0,52	0,57
Jejunum	2,17	2,20	1,95	1,56	2,43	1,55	1,68	2,05
Leber	7,84/1,76	8,16/1,67	7,56/1,83	8,12/1,94	7,47/1,67	7,64/1,91	8,02/2,43	9,08/1,73
Niere	2,02	1,86	1,83	2,04	1,95	2,09	1,83	2,03
Herz	0,72	0,82	0,72	0,77	0,79	0,82	0,69	0,69
Tag 3								
Ileum	0,55	0,85	0,63	0,67	0,68	0,57	0,61	0,70
Jejunum	1,95	1,85	1,40	2,08	1,47	1,70	1,67	2,06
Leber	7,93/1,81	7,85/2,29	8,00/2,03	8,76/1,64	7,21/2,22	6,95/2,14	9,10/2,14	9,13/1,93
Niere	2,10	2,05	2,11	2,16	2,00	2,24	2,35	2,13
Herz	0,83	0,94	0,76	0,92	0,80	0,88	0,81	0,75

C.2.A.I.c. Konzentration von Losartan und EXP 3174 im Blut bzw. Gewebehomogenat nach intravenöser Applikation (3 mg/kg KG) von Losartan ohne gleichzeitige Gabe von Verapamil (p.o.: 20 mg/kg KG)

Losartanstudie: i.v.-Applikation ohne Verapamil								
	Konzentration [$\mu\text{g/g}$ Blut bzw. Gewebehomogenat]							
	Losartan				EXP 3174			
Zeit [min]	60	120	240	360	60	120	240	360
Blut								
Tag 1	1,627	1,131	0,704	0,766	1,176	1,521	0,540	0,508
Tag 2	1,360	0,894	0,797	0,670	1,925	1,438	1,250	0,478
Tag 3	2,228	1,199	0,684	0,668	1,793	0,994	1,091	0,520
<i>MW</i>	1,738	1,075	0,728	0,701	1,631	1,318	0,960	0,502
<i>SEM</i>	0,257	0,092	0,035	0,032	0,231	0,164	0,215	0,012
Ileum								
Tag 1	0,142	1,287	0,430	0,053	0,195	0,472	0,387	0,185
Tag 2	0,143	1,048	0,373	0,059	0,190	0,429	0,319	0,149
Tag 3	0,150	1,087	0,386	0,070	0,140	0,272	0,295	0,213
<i>MW</i>	0,145	1,141	0,396	0,060	0,175	0,391	0,334	0,182
<i>SEM</i>	0,002	0,074	0,017	0,005	0,017	0,061	0,028	0,019
Jejunum								
Tag 1	2,407	1,312	0,229	0,037	0,853	0,332	0,197	0,154
Tag 2	3,092	1,390	0,243	0,043	0,310	0,321	0,149	0,109
Tag 3	2,929	1,075	0,228	0,041	0,384	0,393	0,266	0,151
<i>MW</i>	2,809	1,259	0,233	0,041	0,516	0,349	0,204	0,138
<i>SEM</i>	0,207	0,095	0,005	0,002	0,170	0,023	0,034	0,015
Leber								
Tag 1	15,313	9,095	5,184	2,115	6,411	4,534	4,276	1,666
Tag 2	13,707	4,708	4,553	1,105	5,965	4,622	2,653	2,004
Tag 3	19,726	5,787	2,843	3,796	5,890	7,216	4,952	6,107
<i>MW</i>	16,249	6,530	4,194	2,339	6,088	5,457	3,960	3,259
<i>SEM</i>	1,800	1,320	0,699	0,785	0,163	0,880	0,682	1,427
Niere								
Tag 1	2,233	1,280	0,459	0,172	0,556	0,444	0,209	0,222
Tag 2	3,645	1,970	0,519	0,160	0,521	0,549	0,416	0,213
Tag 3	3,689	1,248	0,436	0,177	0,501	0,483	0,500	0,270
<i>MW</i>	3,189	1,499	0,471	0,170	0,526	0,492	0,375	0,235
<i>SEM</i>	0,478	0,236	0,025	0,005	0,016	0,031	0,087	0,018
Herz								
Tag 1	0,130	0,101	0,098	0,072	0,289	0,204	0,122	0,104
Tag 2	0,185	0,148	0,118	0,052	0,272	0,228	0,182	0,094
Tag 3	0,204	0,102	0,080	0,079	0,260	0,174	0,209	0,099
<i>MW</i>	0,173	0,117	0,099	0,068	0,274	0,202	0,171	0,099
<i>SEM</i>	0,022	0,016	0,011	0,008	0,008	0,016	0,026	0,003

C.2.A.I.d. Konzentration von Losartan und EXP 3174 im Blut bzw. Gewebehomogenat nach intravenöser Applikation (3 mg/kg KG) von Losartan mit gleichzeitiger Gabe von Verapamil (p.o.: 20 mg/kg KG)

Losartanstudie: i.v.-Applikation von Losartan zusammen mit Verapamil p.o.								
	Konzentration [$\mu\text{g/g}$ Blut bzw. Gewebehomogenat]							
	Losartan				EXP 3174			
Zeit [min]	60	120	240	360	60	120	240	360
Blut								
Tag 1	1,828	1,297	0,917	0,692	2,385	1,212	1,071	0,567
Tag 2	1,783	1,196	0,790	0,741	2,218	1,253	1,141	0,641
Tag 3	1,763	1,269	0,805	0,710	2,093	1,974	1,577	0,527
<i>MW</i>	1,791	1,254	0,837	0,714	2,232	1,480	1,263	0,579
<i>SEM</i>	0,019	0,030	0,040	0,014	0,085	0,247	0,158	0,033
Ileum								
Tag 1	0,157	1,595	0,464	0,065	0,240	0,300	0,606	0,290
Tag 2	0,169	1,052	0,533	0,075	0,207	0,505	0,537	0,167
Tag 3	0,156	1,542	0,491	0,073	0,201	0,426	0,625	0,305
<i>MW</i>	0,161	1,396	0,496	0,071	0,216	0,410	0,590	0,254
<i>SEM</i>	0,004	0,173	0,020	0,003	0,012	0,060	0,027	0,044
Jejunum								
Tag 1	4,501	1,139	0,262	0,040	0,664	0,403	0,288	0,104
Tag 2	3,178	1,531	0,269	0,049	0,270	0,348	0,229	0,170
Tag 3	3,216	1,681	0,260	0,046	0,669	0,436	0,148	0,192
<i>MW</i>	3,632	1,450	0,264	0,045	0,535	0,396	0,222	0,155
<i>SEM</i>	0,435	0,162	0,003	0,003	0,132	0,026	0,041	0,026
Leber								
Tag 1	16,387	13,525	9,032	7,601	6,756	7,425	4,757	3,103
Tag 2	19,993	10,737	9,597	6,412	6,486	6,970	8,311	4,630
Tag 3	49,076	14,556	11,025	3,543	11,559	8,775	7,085	4,271
<i>MW</i>	28,485	12,939	9,885	5,852	8,267	7,724	6,718	4,002
<i>SEM</i>	10,348	1,141	0,593	1,205	1,648	0,542	1,042	0,461
Niere								
Tag 1	2,857	2,111	0,550	0,148	0,696	0,428	0,473	0,228
Tag 2	3,795	2,182	0,630	0,307	0,780	0,790	0,619	0,346
Tag 3	4,129	1,429	0,471	0,107	0,508	0,666	0,450	0,253
<i>MW</i>	3,594	1,908	0,550	0,188	0,661	0,628	0,514	0,276
<i>SEM</i>	0,381	0,240	0,046	0,061	0,080	0,106	0,053	0,036
Herz								
Tag 1	0,203	0,139	0,103	0,080	0,139	0,173	0,186	0,110
Tag 2	0,213	0,102	0,108	0,081	0,312	0,133	0,226	0,176
Tag 3	0,269	0,156	0,127	0,077	0,426	0,333	0,168	0,093
<i>MW</i>	0,228	0,132	0,113	0,079	0,292	0,213	0,193	0,127
<i>SEM</i>	0,020	0,016	0,007	0,001	0,083	0,061	0,017	0,025

C.2.A.I.e. Fläche unter den Datenpunkten (AUD) und der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) im Blut bzw. Gewebehomogenat nach intravenöser Applikation (3 mg/kg KG) von Losartan ohne und mit gleichzeitiger Gabe von Verapamil (p.o.: 20 mg/kg KG)

Losartanstudie: i.v.-Applikation								
	Ohne Verapamil				Mit Verapamil			
	AUD [$\mu\text{g}\cdot\text{min/g}$]		AUC [$\mu\text{g}\cdot\text{min/g}$]		AUD [$\mu\text{g}\cdot\text{min/g}$]		AUC [$\mu\text{g}\cdot\text{min/g}$]	
	Losartan	EXP	Losartan	EXP	Losartan	EXP	Losartan	EXP
Blut								
Tag 1	281,08	331,15	652,89	587,97	323,13	343,20	660,97	659,37
Tag 2	257,06	365,91	662,91	626,81	300,44	354,68	656,45	698,90
Tag 3	296,90	305,32	604,94	601,99	306,26	461,24	640,07	737,67
MW	278,35	334,13	640,25	605,59	309,94	386,37	652,50	698,65
SEM	11,58	17,55	17,89	11,36	6,80	37,58	6,35	22,60
Ileum								
Tag 1	174,81	105,88	193,38	164,78	207,80	127,36	222,11	186,02
Tag 2	146,94	91,51	167,93	136,52	168,29	126,17	185,22	155,74
Tag 3	152,82	76,80	177,66	292,71	206,73	137,74	221,80	194,17
MW	158,19	91,40	179,66	198,00	194,27	129,42	209,71	178,64
SEM	8,48	8,39	7,41	48,05	13,00	4,19	12,25	11,69
Jejunum								
Tag 1	220,06	88,32	400,13	179,56	271,48	97,04	645,07	164,94
Tag 2	249,65	62,48	489,29	107,35	268,39	77,14	512,03	183,10
Tag 3	214,41	87,87	448,70	160,69	281,77	88,51	524,07	167,01
MW	228,04	79,56	446,04	149,20	273,88	87,60	560,39	171,68
SEM	10,93	8,54	25,77	21,62	4,04	5,77	42,48	5,74
Leber								
Tag 1	2026,90	1213,50	3479,22	2136,35	3248,76	1627,94	7068,07	3157,89
Tag 2	1447,61	1033,57	2717,08	1938,89	3102,42	2097,09	6484,04	2471,77
Tag 3	1681,56	1786,76	3796,95	2100,37	4317,92	2242,97	8766,91	4446,30
MW	1718,69	1344,61	3331,08	2058,54	3556,37	1989,33	7439,67	3358,65
SEM	168,25	227,09	320,41	60,72	383,11	185,54	684,70	578,77
Niere								
Tag 1	247,59	95,04	429,98	187,72	350,62	129,91	559,83	261,55
Tag 2	358,59	127,85	642,32	237,88	403,77	189,53	711,84	376,06
Tag 3	285,97	134,68	596,59	332,50	315,42	144,40	653,32	278,28
MW	297,38	119,19	556,30	252,70	356,60	154,61	641,66	305,30
SEM	32,55	12,23	64,52	42,45	25,68	17,95	44,27	35,71
Herz								
Tag 1	29,03	47,86	80,42	95,45	35,80	48,65	75,94	223,14
Tag 2	36,12	56,13	62,97	104,00	33,34	58,95	80,00	292,03
Tag 3	29,07	54,56	69,84	116,25	41,99	68,47	82,02	114,66
MW	31,62	52,85	71,08	105,23	37,04	58,69	79,32	209,94
SEM	2,26	2,54	5,08	6,04	2,57	5,72	1,79	51,63

C.2.A.II. Perorale Applikation von Losartan (10 mg/kg KG)**C.2.A.II.a. Rattengewichte [g] bei peroraler Applikation von Losartan**

Losartanstudie: p.o.-Applikation								
	Rattengewichte in [g]							
	Ohne Verapamil				Mit Verapamil			
Zeit [min]	120	240	360	480	120	240	360	480
Tag 1	217	212	212	219	225	225	215	227
Tag 2	223	227	226	220	216	216	227	223
Tag 3	216	212	216	216	214	217	215	219

C.2.A.II.b. Organgewichte [g] bei peroraler Applikation von Losartan

Losartanstudie: p.o.-Applikation								
	Organgewichte in [g]							
	Ohne Verapamil				Mit Verapamil			
Zeit [min]	120	240	360	480	120	240	360	480
Tag 1								
Ileum	0,55	0,74	0,43	0,40	0,57	0,62	0,47	0,52
Jejunum	0,84	0,56	0,86	1,15	0,60	0,90	0,88	0,73
Leber	10,86/1,59	12,6/1,72	12,27/2,31	15,06/1,9	14,98/1,88	14,36/1,68	12,57/1,83	14,26/2,71
Niere	2,89	2,00	2,42	2,70	2,86	2,37	2,36	2,74
Herz	0,83	0,82	0,79	0,90	0,86	0,91	0,86	0,98
Tag 2								
Ileum	0,69	0,70	0,53	0,66	0,52	0,49	0,63	0,44
Jejunum	0,62	0,95	0,48	0,73	0,70	0,64	0,73	0,81
Leber	7,17/1,47	8,82/2,13	9,87/2,77	11,93/1,77	8,28/2,03	10,69/2,74	10,40/2,54	9,58/2,06
Niere	2,21	2,45	2,42	2,51	2,06	2,10	2,52	2,22
Herz	0,86	0,90	1,08	0,80	0,95	0,80	0,93	0,81
Tag 3								
Ileum	0,35	0,58	0,43	0,74	0,37	0,55	0,48	0,41
Jejunum	0,91	0,68	0,93	0,84	0,72	0,91	0,51	0,79
Leber	7,17/1,80	15,67/2,22	8,46/2,19	9,85/1,39	13,05/2,22	8,87/2,20	8,81/2,34	9,86/2,16
Niere	2,37	2,64	2,09	2,15	2,05	2,47	2,21	2,43
Herz	0,94	0,79	0,75	0,83	0,75	0,78	0,74	0,78

C.2.A.II.c. Konzentration von Losartan und EXP 3174 im Blut bzw. Gewebehomogenat nach peroraler Applikation (10 mg/kg KG) von Losartan ohne gleichzeitige Gabe von Verapamil (p.o.: 20 mg/kg KG)

Losartanstudie: p.o.-Applikation ohne Verapamil								
	Konzentration [$\mu\text{g/g}$ Blut bzw. Gewebehomogenat]							
	Losartan				EXP 3174			
Zeit [min]	120	240	360	480	120	240	360	480
Blut								
Tag 1	0,793	-	0,164	0,110	0,992	-	0,451	0,295
Tag 2	0,887	0,220	0,163	0,124	0,939	0,686	0,641	0,457
Tag 3	0,923	0,143	0,165	0,141	0,765	1,044	0,806	0,387
<i>MW</i>	<i>0,868</i>	<i>0,121</i>	<i>0,164</i>	<i>0,125</i>	<i>0,899</i>	<i>0,577</i>	<i>0,633</i>	<i>0,380</i>
<i>SEM</i>	<i>0,039</i>	<i>0,064</i>	<i>0,001</i>	<i>0,009</i>	<i>0,068</i>	<i>0,306</i>	<i>0,102</i>	<i>0,047</i>
Ileum								
Tag 1	0,551	0,569	0,238	0,158	0,342	0,295	0,204	0,146
Tag 2	0,546	0,246	0,225	0,161	0,243	0,166	0,262	0,174
Tag 3	0,493	0,273	0,164	0,124	0,194	0,300	0,210	0,162
<i>MW</i>	<i>0,530</i>	<i>0,363</i>	<i>0,209</i>	<i>0,148</i>	<i>0,260</i>	<i>0,254</i>	<i>0,225</i>	<i>0,161</i>
<i>SEM</i>	<i>0,019</i>	<i>0,104</i>	<i>0,023</i>	<i>0,012</i>	<i>0,044</i>	<i>0,044</i>	<i>0,018</i>	<i>0,008</i>
Jejunum								
Tag 1	0,148	0,185	0,122	0,076	0,141	0,189	0,149	0,137
Tag 2	0,203	0,265	0,155	0,035	0,166	0,158	0,150	0,120
Tag 3	0,265	0,196	0,088	0,027	0,174	0,153	0,144	0,091
<i>MW</i>	<i>0,205</i>	<i>0,215</i>	<i>0,122</i>	<i>0,046</i>	<i>0,160</i>	<i>0,166</i>	<i>0,147</i>	<i>0,116</i>
<i>SEM</i>	<i>0,034</i>	<i>0,025</i>	<i>0,019</i>	<i>0,015</i>	<i>0,010</i>	<i>0,011</i>	<i>0,002</i>	<i>0,013</i>
Leber								
Tag 1	37,998	30,963	8,781	3,179	5,478	6,000	4,743	4,147
Tag 2	26,479	27,947	7,793	3,187	8,667	5,383	5,859	5,161
Tag 3	39,978	30,174	7,172	3,038	3,641	6,789	6,869	5,141
<i>MW</i>	<i>34,818</i>	<i>29,695</i>	<i>7,915</i>	<i>3,135</i>	<i>5,927</i>	<i>6,057</i>	<i>5,824</i>	<i>4,816</i>
<i>SEM</i>	<i>4,209</i>	<i>0,903</i>	<i>0,468</i>	<i>0,048</i>	<i>1,467</i>	<i>0,407</i>	<i>0,614</i>	<i>0,335</i>
Niere								
Tag 1	1,657	0,766	0,326	0,323	0,547	0,297	0,313	0,204
Tag 2	1,936	0,658	0,488	0,252	0,553	0,362	0,257	0,251
Tag 3	1,577	0,591	0,436	0,421	0,337	0,443	0,373	0,245
<i>MW</i>	<i>1,723</i>	<i>0,672</i>	<i>0,417</i>	<i>0,332</i>	<i>0,479</i>	<i>0,367</i>	<i>0,315</i>	<i>0,233</i>
<i>SEM</i>	<i>0,109</i>	<i>0,051</i>	<i>0,048</i>	<i>0,049</i>	<i>0,071</i>	<i>0,042</i>	<i>0,033</i>	<i>0,015</i>
Herz								
Tag 1	-	0,108	0,095	0,061	-	0,131	0,093	0,062
Tag 2	0,241	0,130	0,077	0,048	0,195	0,107	0,082	0,080
Tag 3	0,247	0,121	0,093	0,047	0,191	0,180	0,106	0,084
<i>MW</i>	<i>0,244</i>	<i>0,120</i>	<i>0,088</i>	<i>0,052</i>	<i>0,193</i>	<i>0,139</i>	<i>0,093</i>	<i>0,075</i>
<i>SEM</i>	<i>0,002</i>	<i>0,006</i>	<i>0,006</i>	<i>0,005</i>	<i>0,002</i>	<i>0,022</i>	<i>0,007</i>	<i>0,007</i>

C.2.A.II.d. Konzentration von Losartan und EXP 3174 im Blut bzw. Gewebehomogenat nach peroraler Applikation (10 mg/kg KG) von Losartan mit gleichzeitiger Gabe von Verapamil (p.o.: 20 mg/kg KG)

Losartanstudie: p.o.-Applikation von Losartan zusammen mit Verapamil p.o.								
	Konzentration [$\mu\text{g/g}$ Blut bzw. Gewebehomogenat]							
	Losartan				EXP 3174			
Zeit [min]	120	240	360	480	120	240	360	480
Blut								
Tag 1	1,868	0,778	0,255	0,279	1,667	0,957	0,722	0,547
Tag 2	1,522	0,612	0,306	0,261	1,832	1,097	1,165	0,517
Tag 3	0,869	0,341	0,242	0,179	1,409	1,068	1,106	0,547
<i>MW</i>	1,420	0,577	0,268	0,240	1,636	1,041	0,998	0,537
<i>SEM</i>	0,293	0,128	0,019	0,031	0,123	0,043	0,139	0,010
Ileum								
Tag 1	0,989	0,592	0,553	0,393	0,279	0,218	0,194	0,223
Tag 2	1,315	0,551	0,366	0,285	0,299	0,446	0,205	0,210
Tag 3	0,978	0,75	0,512	0,337	0,278	0,399	0,310	0,130
<i>MW</i>	1,094	0,506	0,477	0,338	0,285	0,354	0,236	0,188
<i>SEM</i>	0,111	0,067	0,057	0,031	0,007	0,070	0,037	0,029
Jejunum								
Tag 1	0,544	0,285	0,360	0,060	0,205	0,158	0,130	0,135
Tag 2	0,597	0,465	0,173	0,049	0,140	0,260	0,155	0,139
Tag 3	0,56	0,389	0,174	0,064	0,199	0,165	0,236	0,147
<i>MW</i>	0,566	0,380	0,236	0,058	0,182	0,194	0,174	0,140
<i>SEM</i>	0,016	0,052	0,062	0,005	0,021	0,033	0,032	0,004
Leber								
Tag 1	41,231	46,793	7,717	3,265	6,981	6,288	7,724	5,697
Tag 2	39,732	32,208	9,809	3,153	6,157	7,334	8,407	5,544
Tag 3	27,804	32,610	7,448	3,546	5,547	7,195	5,598	5,456
<i>MW</i>	36,255	37,204	8,325	3,321	6,228	6,939	7,243	5,566
<i>SEM</i>	4,248	4,796	0,746	0,117	0,415	0,328	0,846	0,070
Niere								
Tag 1	3,702	0,831	0,659	0,694	0,517	0,472	0,365	0,289
Tag 2	3,305	0,924	0,534	0,211	0,454	0,441	0,312	0,185
Tag 3	3,444	0,794	0,623	0,260	0,838	0,503	0,373	0,278
<i>MW</i>	3,484	0,850	0,605	0,388	0,603	0,472	0,350	0,251
<i>SEM</i>	0,116	0,039	0,037	0,154	0,119	0,018	0,019	0,033
Herz								
Tag 1	-	0,138	0,171	0,096	-	0,124	0,153	0,100
Tag 2	0,394	0,142	0,121	0,102	0,160	0,170	0,171	0,106
Tag 3	0,425	0,268	0,137	0,069	0,306	0,305	0,170	0,096
<i>MW</i>	0,410	0,183	0,143	0,089	0,233	0,199	0,165	0,101
<i>SEM</i>	0,013	0,043	0,015	0,010	0,060	0,054	0,006	0,003

C.2.A.II.e. Fläche unter den Datenpunkten (AUD) und der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) im Blut bzw. Gewebehomogenat nach peroraler Applikation (10 mg/kg KG) von Losartan ohne und mit gleichzeitiger Gabe von Verapamil (p.o.: 20 mg/kg KG)

Losartanstudie: p.o.-Applikation								
	Ohne Verapamil				Mit Verapamil			
	AUD [$\mu\text{g}\cdot\text{min/g}$]		AUC [$\mu\text{g}\cdot\text{min/g}$]		AUD [$\mu\text{g}\cdot\text{min/g}$]		AUC [$\mu\text{g}\cdot\text{min/g}$]	
	Losartan	EXP	Losartan	EXP	Losartan	EXP	Losartan	EXP
Blut								
Tag 1	131,34	218,02	196,35	366,40	252,81	334,31	400,72	605,81
Tag 2	106,61	243,05	178,91	553,84	217,04	412,33	351,00	714,52
Tag 3	100,91	291,15	178,88	597,94	132,88	378,22	222,11	736,97
MW	112,95	250,74	184,71	506,06	200,91	374,95	324,61	685,77
SEM	9,34	21,46	5,82	70,98	35,55	22,58	53,22	40,50
Ileum								
Tag 1	139,46	89,12	215,53	177,49	220,36	79,54	445,18	402,66
Tag 2	98,90	76,42	179,67	514,13	206,05	108,71	344,38	263,32
Tag 3	89,50	82,58	148,41	342,28	185,34	109,52	379,59	209,79
MW	109,29	82,71	181,20	344,63	203,92	99,26	389,72	291,92
SEM	15,33	3,67	19,39	97,19	10,17	9,86	29,54	57,48
Jejunum								
Tag 1	50,39	57,19	103,28	65,65	113,69	54,98	163,68	169,75
Tag 2	64,76	54,03	88,15	210,55	115,22	64,33	159,74	120,21
Tag 3	51,49	51,47	72,56	122,33	105,20	68,83	151,07	450,24
MW	55,55	54,23	88,00	132,84	111,37	62,71	158,16	246,73
SEM	4,62	1,65	8,87	42,16	3,12	4,08	3,72	102,75
Leber								
Tag 1	7231,14	1866,77	10011,94	7012,30	9210,98	2442,20	12146,35	21399,08
Tag 2	6068,84	2178,45	8240,83	6714,73	7615,15	2590,98	10514,20	47282,86
Tag 3	7062,51	2165,79	9882,57	7049,60	6688,03	2195,37	8974,93	25087,45
MW	6787,50	2070,34	9378,45	6925,54	7838,05	2409,52	10545,16	31256,46
SEM	362,61	101,82	570,03	105,96	736,79	115,37	915,64	8083,63
Niere								
Tag 1	249,91	118,27	402,45	236,48	442,59	148,76	777,85	357,43
Tag 2	268,79	122,53	429,89	255,01	385,93	128,70	612,08	238,21
Tag 3	243,04	132,88	432,99	460,84	392,28	172,13	635,89	310,90
MW	253,91	124,56	421,78	317,44	406,93	149,86	675,27	302,18
SEM	7,70	4,34	9,70	71,90	17,92	12,55	51,75	34,69
Herz								
Tag 1	21,55	22,66	61,71	58,16	34,50	31,80	123,30	172,80
Tag 2	42,15	39,13	66,95	78,98	61,38	56,83	109,73	189,13
Tag 3	43,38	50,78	69,52	95,60	78,28	81,06	117,88	131,33
MW	35,69	37,52	66,06	77,58	58,05	56,56	116,97	164,42
SEM	7,08	8,16	2,30	10,83	12,75	14,22	3,94	17,20

C.2.B. EXP 3174-Studie zur Ermittlung der kinetischen Parameter und Untersuchung der EXP 3174/Verapamil-Interaktion

C.2.B.I. Intravenöse Applikation von EXP 3174

C.2.B.I.a. Rattengewichte [g] bei intravenöser Applikation von EXP 3174

EXP 3174-Studie: i.v.-Applikation								
	Rattengewichte in [g]							
	Ohne Verapamil				Mit Verapamil			
Zeit [min]	60	120	240	360	60	120	240	360
Tag 1	222	220	217	223	205	224	223	200
Tag 2	241	224	230	201	248	240	239	223
Tag 3	255	275	292	270	258	270	245	260

C.2.B.I.b. Organgewichte [g] bei intravenöser Applikation von EXP 3174

EXP 3174-Studie: i.v.-Applikation								
	Organgewichte in [g]							
	Ohne Verapamil				Mit Verapamil			
Zeit [min]	60	120	240	360	60	120	240	360
Tag 1								
Ileum	0,61	0,91	0,73	0,85	0,71	0,93	0,10	0,70
Jejunum	1,67	1,15	1,87	2,41	1,45	1,39	1,84	1,81
Leber	7,34/2,20	7,68/2,04	8,13/2,34	9,76/2,04	6,72/1,95	7,98/2,18	8,67/2,05	7,82/1,86
Niere	2,14	1,92	2,08	2,38	1,93	1,97	2,11	2,11
Herz	0,70	0,72	0,79	0,82	0,80	0,68	0,78	0,70
Tag 2								
Ileum	1,05	0,61	0,70	1,03	0,88	0,80	0,96	0,84
Jejunum	1,66	2,02	2,19	1,95	1,45	1,91	2,11	2,02
Leber	8,66/2,03	7,52/2,06	9,24/1,87	8,90/2,29	9,20/1,83	8,29/2,11	9,31/2,44	9,01/1,90
Niere	2,25	1,98	2,33	2,10	2,09	2,24	2,15	2,06
Herz	0,78	0,76	0,83	0,82	0,78	0,77	0,75	0,78
Tag 3								
Ileum	0,96	0,79	0,76	0,65	0,83	0,84	0,63	0,55
Jejunum	1,82	1,81	1,79	1,55	1,80	1,62	1,80	2,03
Leber	9,13/2,26	9,71/2,47	9,87/2,45	11,1/1,99	9,67/2,36	8,90/1,99	9,04/2,40	10,00/1,99
Niere	2,37	2,61	2,56	2,49	2,70	2,62	2,14	2,41
Herz	1,09	0,99	1,03	0,93	0,96	1,01	0,86	0,94

C.2.B.I.c. Konzentration von EXP 3174 im Blut bzw. Gewebehomogenat nach intravenöser Applikation (3 mg/kg KG) von EXP 3174 ohne und mit gleichzeitiger Gabe von Verapamil (p.o.: 20 mg/kg KG)

EXP 3174-Studie: i.v.-Applikation								
	Konzentration [$\mu\text{g/g}$ Blut bzw. Gewebehomogenat]							
	Ohne Verapamil				Mit Verapamil			
Zeit [min]	60	120	240	360	60	120	240	360
Blut								
Tag 1	10,395	4,490	2,750	1,463	13,302	4,931	2,806	1,162
Tag 2	10,932	5,578	2,657	1,022	10,395	6,231	1,648	1,553
Tag 3	7,781	4,879	1,584	1,419	9,343	4,477	2,881	1,276
<i>MW</i>	9,703	1,982	2,330	1,301	11,013	5,213	2,445	1,330
<i>SEM</i>	0,973	0,318	0,374	0,140	1,184	0,526	0,399	0,116
Ileum								
Tag 1	0,368	1,444	0,618	0,359	0,307	1,667	0,732	0,612
Tag 2	0,281	1,315	0,617	0,334	0,583	1,753	0,654	0,348
Tag 3	0,462	1,602	0,729	0,476	0,320	1,742	0,771	0,423
<i>MW</i>	0,370	1,453	0,655	0,390	0,403	1,721	0,719	0,461
<i>SEM</i>	0,052	0,083	0,037	0,044	0,090	0,027	0,034	0,079
Jejunum								
Tag 1	1,368	0,838	0,616	0,398	1,056	1,086	0,656	0,479
Tag 2	0,941	0,743	0,542	0,454	1,530	0,902	0,524	0,454
Tag 3	0,960	0,776	0,602	0,389	1,271	0,919	0,650	0,464
<i>MW</i>	1,090	0,786	0,587	0,414	1,286	0,969	0,610	0,466
<i>SEM</i>	0,139	0,028	0,023	0,020	0,137	0,059	0,043	0,007
Leber								
Tag 1	4,019	1,971	2,014	2,701	5,954	4,316	1,665	3,185
Tag 2	6,202	4,950	1,705	1,019	6,234	4,761	1,666	2,896
Tag 3	2,924	2,283	1,587	0,890	4,745	4,639	2,817	2,308
<i>MW</i>	4,382	3,068	1,769	1,537	5,644	4,572	2,049	2,796
<i>SEM</i>	0,963	0,946	0,127	0,583	0,457	0,133	0,384	0,258
Niere								
Tag 1	3,741	2,835	1,255	0,829	4,242	3,299	1,561	0,955
Tag 2	3,130	2,903	1,568	0,806	4,245	3,212	1,629	0,957
Tag 3	3,173	2,057	1,526	1,009	4,663	2,775	1,771	1,127
<i>MW</i>	3,348	2,598	1,449	0,881	4,383	3,095	1,654	1,013
<i>SEM</i>	0,197	0,271	0,098	0,064	0,140	0,162	0,062	0,057
Herz								
Tag 1	1,123	0,799	0,436	0,277	1,812	0,973	0,531	0,411
Tag 2	1,305	0,995	0,693	0,294	1,104	0,922	0,527	0,385
Tag 3	1,765	0,866	0,474	0,336	1,853	0,881	0,603	0,336
<i>MW</i>	1,398	0,887	0,534	0,302	1,590	0,925	0,554	0,377
<i>SEM</i>	0,191	0,058	0,080	0,017	0,243	0,026	0,025	0,022

C.2.B.II. Perorale Applikation von EXP 3174**C.2.B.II.a. Rattengewichte [g] bei peroraler Applikation von EXP 3174**

EXP 3174-Studie: p.o.-Applikation								
	Rattengewichte in [g]							
	Ohne Verapamil				Mit Verapamil			
Zeit [min]	120	240	360	480	120	240	360	480
Tag 1	204	207	205	205	213	210	214	205
Tag 2	203	205	215	204	200	204	206	205
Tag 3	209	215	209	201	213	213	213	207

C.2.B.II.b. Organgewichte [g] bei peroraler Applikation von EXP 3174

EXP 3174-Studie: p.o.-Applikation								
	Organgewichte in [g]							
	Ohne Verapamil				Mit Verapamil			
Zeit [min]	120	240	360	480	120	240	360	480
Tag 1								
Ileum	0,40	0,41	0,33	0,36	0,36	0,52	0,41	0,43
Jejunum	0,75	0,80	0,80	0,78	0,62	0,55	0,51	0,75
Leber	6,54/1,36	8,65/1,98	7,48/1,51	8,60/1,56	6,41/1,43	8,32/1,63	10,75/1,98	8,63/1,46
Niere	2,01	2,33	2,06	1,93	1,94	2,19	2,19	1,78
Herz	0,74	0,83	0,75	0,76	0,79	0,75	0,85	0,77
Tag 2								
Ileum	0,30	0,30	0,36	0,34	0,29	0,26	0,37	0,33
Jejunum	0,70	0,81	0,81	0,86	0,61	0,64	0,68	0,80
Leber	6,64/1,30	8,28/1,47	8,50/1,40	9,30/1,10	6,79/1,46	7,17/1,32	8,33/1,49	10,22/1,92
Niere	1,92	2,25	2,20	2,13	2,14	2,33	1,84	2,28
Herz	0,64	0,83	0,69	0,80	0,86	0,81	0,78	0,82
Tag 3								
Ileum	0,27	0,40	0,33	0,38	0,31	0,36	0,34	0,31
Jejunum	0,56	0,56	0,69	0,82	0,68	0,85	0,79	0,84
Leber	8,59/1,21	9,68/2,08	9,28/2,11	8,05/1,34	9,39/1,39	9,13/2,05	11,62/1,75	9,40/1,46
Niere	2,07	2,04	2,07	1,99	2,10	2,13	2,20	2,00
Herz	0,68	0,76	0,71	0,69	0,78	0,69	0,72	0,73

C.2.B.II.c. Konzentration von EXP 3174 im Blut bzw. Gewebehomogenat nach peroraler Applikation (10 mg/kg KG) von EXP 3174 ohne und mit gleichzeitiger Gabe von Verapamil (p.o.: 20 mg/kg KG)

EXP 3174-Studie: p.o.-Applikation								
	Konzentration [$\mu\text{g/g}$ Blut bzw. Gewebehomogenat]							
	Ohne Verapamil				Mit Verapamil			
Zeit [min]	120	240	360	480	120	240	360	480
Blut								
Tag 1	1,052	0,499	0,387	0,274	1,137	0,475	0,566	0,344
Tag 2	0,772	0,438	0,415	0,369	1,027	0,428	0,340	0,325
Tag 3	1,083	0,408	0,395	0,362	1,235	0,450	0,306	0,430
MW	0,969	0,448	0,399	0,335	1,133	0,451	0,404	0,367
SEM	0,099	0,027	0,009	0,031	0,060	0,013	0,082	0,032
Ileum								
Tag 1	0,508	0,209	0,214	0,167	0,386	0,288	0,224	0,131
Tag 2	0,420	0,191	0,173	0,138	0,599	0,191	0,171	0,178
Tag 3	0,597	0,171	0,145	0,095	0,555	0,246	0,151	0,131
MW	0,509	0,190	0,177	0,133	0,513	0,242	0,182	0,146
SEM	0,051	0,011	0,020	0,021	0,065	0,028	0,022	0,016
Jejunum								
Tag 1	0,377	0,105	0,138	0,142	0,385	0,163	0,150	0,130
Tag 2	0,286	0,147	0,133	0,121	0,295	0,124	0,144	0,139
Tag 3	0,272	0,156	0,121	0,082	0,432	0,196	0,119	0,119
MW	0,312	0,136	0,131	0,115	0,371	0,161	0,138	0,130
SEM	0,033	0,016	0,005	0,018	0,040	0,021	0,009	0,006
Leber								
Tag 1	17,397	18,625	8,948	13,669	24,945	17,894	16,920	10,428
Tag 2	24,885	13,107	10,231	9,612	24,457	16,303	10,261	11,217
Tag 3	17,027	18,494	15,001	7,807	24,596	20,442	21,428	11,860
MW	19,770	16,742	11,393	10,373	24,666	18,213	16,203	11,168
SEM	2,560	1,818	1,842	1,743	0,145	1,205	3,244	0,414
Niere								
Tag 1	0,560	0,251	0,229	0,193	0,680	0,339	0,307	0,200
Tag 2	0,535	0,256	0,227	0,168	0,602	0,261	0,219	0,165
Tag 3	0,583	0,330	0,206	0,246	0,636	0,348	0,295	0,301
MW	0,559	0,279	0,221	0,202	0,639	0,316	0,274	0,222
SEM	0,014	0,025	0,007	0,023	0,023	0,027	0,028	0,041
Herz								
Tag 1	0,199	0,120	0,081	0,047	0,236	0,123	0,077	0,060
Tag 2	0,217	0,102	0,064	0,076	0,223	0,103	0,094	0,095
Tag 3	0,228	0,075	0,054	0,057	0,314	0,107	0,067	0,036
MW	0,215	0,099	0,066	0,060	0,258	0,111	0,079	0,064
SEM	0,008	0,013	0,008	0,008	0,028	0,006	0,008	0,017

C.2.B.II.d. Fläche unter den Datenpunkten (AUD) und der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) im Blut bzw. Gewebehomogenat nach intravenöser und peroraler Applikation (i.v.: 3 mg/kg KG; p.o.: 10 mg/kg KG) von EXP 3174 ohne und mit gleichzeitiger Gabe von Verapamil (p.o.: 20 mg/kg KG)

EXP 3174-Studie:								
	i.v.-Applikation				p.o.-Applikation			
	Ohne Verapamil		Mit Verapamil		Ohne Verapamil		Mit Verapamil	
	[µg·min/g]				[µg·min/g]			
	AUD	AUC	AUD	AUC	AUD	AUC	AUD	AUC
Blut								
Tag 1	1133,72	2161,22	1249,25	2446,68	185,82	320,13	213,83	402,24
Tag 2	1210,20	2160,99	1163,68	2087,10	170,87	396,90	173,34	323,12
Tag 3	947,73	1691,24	1105,57	2020,10	183,10	358,18	190,67	368,13
MW	1097,22	2004,48	1172,83	2184,63	179,93	358,40	192,61	364,50
SEM	77,94	156,62	41,73	132,45	4,60	22,16	11,73	22,91
Ileum								
Tag 1	236,63	320,60	283,86	448,72	91,33	176,30	92,41	163,92
Tag 2	220,91	296,39	274,67	361,20	77,11	146,10	90,06	170,20
Tag 3	273,99	395,86	284,33	375,25	79,55	132,81	88,79	149,51
MW	243,84	337,62	280,95	395,06	82,66	151,74	90,42	161,24
SEM	15,74	29,95	3,14	27,14	4,39	12,87	1,06	6,12
Jejunum								
Tag 1	214,23	413,52	236,94	465,22	60,35	133,46	68,45	132,53
Tag 2	187,37	430,20	217,13	427,97	58,06	123,61	58,19	144,25
Tag 3	194,23	395,34	226,68	452,69	54,52	95,62	70,93	123,45
MW	198,61	413,02	226,92	448,63	57,61	117,56	65,86	133,41
SEM	8,06	10,07	5,72	10,94	1,73	11,33	3,90	6,02
Leber								
Tag 1	701,68	3753,81	957,93	2234,65	5174,53	15616,96	6300,09	12834,74
Tag 2	897,33	1454,50	898,25	2070,36	4870,32	9615,10	5328,19	10914,13
Tag 3	537,03	971,47	1063,29	2167,29	5509,48	10983,24	7211,75	16372,42
MW	712,01	2059,93	1003,49	2157,43	5184,78	12071,77	6280,01	13373,76
SEM	104,14	858,34	31,24	47,68	184,58	1816,06	543,83	1598,56
Niere								
Tag 1	567,67	967,09	668,69	1130,34	102,69	198,54	130,32	233,62
Tag 2	591,58	966,72	669,32	1140,11	100,12	184,31	103,60	183,75
Tag 3	524,04	1024,81	669,86	1244,72	114,03	227,00	133,42	301,94
MW	561,10	986,21	669,29	1171,72	105,61	203,28	122,45	239,77
SEM	19,77	19,30	0,34	36,61	4,27	12,55	9,47	34,26
Herz								
Tag 1	174,58	308,57	304,75	584,63	38,89	63,19	41,77	70,18
Tag 2	229,50	385,03	202,47	375,56	37,47	70,23	42,67	92,23
Tag 3	207,94	396,79	227,42	429,42	32,63	57,99	42,08	66,90
MW	204,01	363,46	244,88	463,20	36,33	63,80	42,17	76,44
SEM	15,98	27,66	30,79	62,67	1,89	3,55	0,26	7,95

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Cornelia Dreßler, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe erstellt habe. Des weiteren habe ich nur die angegebenen Hilfsmittel und aufgeführte Literatur benutzt und die daraus wörtlich bzw. inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde nur der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht, um den Doktorgrad zu erwerben.

Freiberg, 12.07.2002

Lebenslauf

Cornelia Dreßler

10. 05. 1973 geboren in Freiberg / Sachsen als Tochter von Rosemarie Dreßler, geb. Fischer, und Roland Dreßler
- 1979 - 1989 Polytechnische Oberschule "Theodor Körner" Freiberg
1989 - 1991 Erweiterte Oberschule "Geschwister Scholl" Freiberg
Juni 1991 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 1991 - 1992 "Glückauf-Apotheke" Freiberg
Berufliches Schulzentrum Chemnitz
Dezember 1992 Abschluss: Apothekenhelferin
- 1992 - 1996 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
September 1994 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
September 1996 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Oktober 1996 - März 1997 Pharmazie-Praktikum an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Chemie, Anfertigung einer Diplomarbeit unter Leitung von Prof. H. Spahn-Langguth (Losartan und sein aktiver Metabolit EXP 3174: Ermittlung von partiellen Clearances in vitro und in vivo an der Ratte)
- April 1997 - September 1997 Pharmazie-Praktikum in der "Park-Apotheke" Freiberg
Juli 1997 Abschluss: Diplompharmazeut
Oktober 1997 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 1997 Approbation als Apothekerin
- seit Januar 1998 Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. H. Spahn-Langguth am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Januar 1998 - April 1999 Förderung durch ein Stipendium des Graduiertenkolleges des Landes Sachsen-Anhalt
- Januar - Februar 1998 Forschungsaufenthalt am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, AG Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, Populationspharmakokinetik (NONMEM) (Dr. R. Port)
- Juni - September 1998 Forschungsaufenthalt an der University of Florida, School of Pharmacy, Gainesville, Florida, USA (Prof. H. Derendorf)
- seit 1. Mai 1999 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- August - September 1999 Forschungsaufenthalt in der Abteilung für Pharmakokinetik und Arzneistoffmetabolismus, Astra Hässle AB, Mölndal, Schweden (Prof. P. Langguth, Prof. C.G. Regardh)
- Juli - September 2000 Forschungsaufenthalt an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Pharmazie, Lehrstuhl Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie (Prof. P. Langguth)

Präsentationen

Bisherige Publikationen

Dressler C.

Losartan und sein aktiver Metabolit EXP 3174: Ermittlung von partiellen Clearances in vitro und in vivo an der Ratte.

Diplomarbeit Halle 1997

Hilgeroth A., Dressler C., Neuhoff S., Spahn-Langguth H. und Langguth P.

Dimeric 4-aryl-1,4-dihydropyridines as novel HIV-1 protease inhibitors – Affinities to intestinal P-glycoprotein.

Die Pharmazie, 2000, 55 (10), 784-785

Neuhoff S., Langguth P., Dressler C., Andersson T.B., Regardh C.G. und Spahn-Langguth H.

Affinities at the verapamil binding site of MDR1-encoded P-glycoprotein: Drugs and analogs, stereoisomers and metabolites.

International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2000, 38 (4), 168-179

Spahn-Langguth H., Dressler C. und Leisen C.

Intestinal drug transport: Stereochemical aspects.

In Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 153, Stereochemical aspects of drug action and disposition.

Eichelbaum M., Testa B., Somogyi A. (Eds.) Springer-Verlag Heidelberg, 2002, Chapter 11; im Druck

Leisen C., Dressler C., Herber B., Langguth P. und Spahn-Langguth H.

Lipophilicities of baclofen ester prodrugs correlate with affinities to the ATP-dependent efflux pump P-glycoprotein – Relevance for their penetration through the blood-brain barrier?

Pharmaceutical Research 2002; in Revision

Vorträge

Dressler C., Langguth P. und Spahn-Langguth H.

The kinetics of losartan and its active metabolite EXP 3174 in rats: Intestinal vs. hepatic processes.

1. European Graduate Student Meeting, 1998, 20.-22.02. 1998 in Frankfurt/Main

Die Pharmazie, 1998, 53 (Suppl. 1), 13

Posterpräsentationen

Dressler C., Langguth P. und Spahn-Langguth H.

The kinetics of losartan and its active metabolite EXP 3174 in rats: Intestinal vs. hepatic processes.

1. European Graduate Student Meeting, 1998, 20.-22.02. 1998 in Frankfurt/Main

Die Pharmazie, 1998, 53 (Suppl. 1), 13

Dressler C., Langguth P., Ader P. und Spahn-Langguth H.

Losartan and its active metabolite EXP 3174: Estimation partial clearances in in-vitro und in-vivo rat studies.

39. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 17.-19.03. 1998 in Mainz

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 1998, 357 (Suppl.), R6, 11

Dressler C., Spahn-Langguth H. und Langguth P.

Pharmacokinetic profile of the active losartan metabolite EXP 3174 in rats: Administration of drug vs. metabolite.

DoktorandInnentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft DPhG, 11.-13.03. 1999 in Freiburg i. Br.

Archiv der Pharmazie, 1999, 331 (Suppl. 1), 31

Dressler C., Langguth P. und Spahn-Langguth H.

Kinetics of the active losartan metabolite EXP 3174 in rats following dosage of drug or metabolite.

40. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 09.-11.03. 1999 in Mainz

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 1999, 359 (Suppl.), R120, 465

Dressler C., Spahn-Langguth H. und Langguth P.

Pharmacokinetic profile of the active losartan metabolite EXP 3174 in rats: Administration of drug vs. metabolite.

British Journal of Clinical Pharmacology, Abstracts of the joint meeting of 3rd Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT) and 4th Jerusalem Conference on Pharmaceutical Sciences and Clinical Pharmacology (JC4), 3.-8.10.1999 in Jerusalem, 38

Dressler C., Hanafy A., Neuhoﬀ S., Langguth P. und Spahn-Langguth H.

Drug/metabolite pairs: Comparison of their affinities to intestinal P-glycoprotein (P-GP).

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft DPhG, 4.-10. 10. 2000 in Münster

Archiv der Pharmazie, 2000, 333 (Suppl. 2), 42

Leisen C., Dressler C., Herber B., Langguth P. und Spahn-Langguth H.

Correlation of lipophilities of baclofen ester prodrugs and affinities to the ATP-dependent efflux pump P-glycoprotein.

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft DPhG, 4.-10. 10. 2000 in Münster

Archiv der Pharmazie, 2000, 333 (Suppl. 2), 50

Dressler C., Neuhoﬀ S., Andersson T.B., Regardh C.G., Leisen C., Langguth P. und Spahn-Langguth H.
The duration of culturing may affect active transport in Caco-2 cells: Amino acid- and peptide transporter vs. P-glycoprotein.

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft DPhG, 10.-13. 10. 2001 in Halle/Saale

Archiv der Pharmazie, 2001, 334 (Suppl. 2), 34

Koggel A., Dressler C., Peinhardt G., Spahn-Langguth H. und Langguth P.

Affinities to the exsorptive transporter P-glycoprotein: ^3H -Talinolol as radioligand in binding studies.

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft DPhG, 10.-13. 10. 2001 in Halle/Saale

Archiv der Pharmazie, 2001, 334 (Suppl. 2), 74

Langguth P., Koggel A., Dressler C., Peinhardt G. und Spahn-Langguth H.

Binding studies for affinity screening to the exsorptive transporter P-glycoprotein: ^3H -Talinolol as radioligand.

International Isotope Society, Bad Vilbel, Juni 2001
