Abschlussbericht des Forschungsvorhabens

„Wirkstofftransport-basierte Konzepte und *Drug Delivery*-Technologien zur Optimierung der klinischen Anwendung von Arzneimitteln“

BMBF-Innovationsinitiative Neue Länder „Unternehmen Region“ - InnoProfile

Zuwendungsempfänger: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Medizinische Fakultät
Institut für Pharmakologie

Förderkennzeichen: 03IP612

Laufzeit des Vorhabens: 01.07.2007 – 30.06.2012

Beteiligte Antragsteller

Prof. Dr. Werner Siegmund
Institut für Pharmakologie, Abteilung für Klinische Pharmakologie

Prof. Dr. Werner Weitschies
Institut für Pharmazie, Abt. Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie

Prof. Dr. Heyo K. Kroemer und Prof. Dr. Dieter Rosskopf
Institut für Pharmakologie, Abteilung für Allgemeine Pharmakologie

Prof. Dr. Norbert Hosten, Institut für Diagnostische Radiologie und Neuroradiologie

Berichtsdatum: 20.12.2012

Autor des Berichts: Prof. Dr. Stefan Oswald (Leiter der Nachwuchsgruppe)

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

1. Kurzdarstellung

1.1 Aufgabenstellung

Das Anfluten eines Arzneimittels im Organismus nach oraler Einnahme ist das Ergebnis eines hoch komplexen Geschehens, in dem folgende Faktoren von besonderer Bedeutung sind: (1) Freisetzungseigenschaften der Arzneiform, (2) physiologische Lösungsbedingungen und (3) Resorptionseigenschaften des Darmes am Ort der Arzneistoffliberation, (4) biochemische Veränderung des Arzneistoffes auf dem Weg in den Blutkreislauf (z.B. durch Enzyme in der Leber) sowie (5) Funktion der Transportmechanismen zur Aufnahme an den Ort der Wirkung. Diese Prozesse sind extrem dynamisch und verlaufen zum Teil diskontinuierlich und gleichzeitig ab. Obwohl der Großteil aller Arzneistoffe oral eingenommen wird, sind die genannten Prozesse bisher nur unzureichend verstanden und lassen sich nur schwer vorhersagen.

Die übergeordnete Fragestellung des oben genannten InnoProfile-Forschungsvorhabens stellte die Charakterisierung der Transporterprotein-vermittelten Absorptions- und Verteilungsvorgänge von Arzneistoffen im menschlichen Organismus dar (insbesondere im Darm und in zellulären Zielkompartimenten). Auf diesen und bereits etablierten Erkenntnissen aufbauend sollten neue Prinzipien der Arzneistofffreisetzung (*Drug Delivery*-Systeme) entwickelt und Möglichkeiten der *In vitro*-Prädiktion der Arzneistofffreigabe aus der Arzneiform geschaffen werden.

Die Nachwuchsforschergruppe sollte sich bevorzugt solchen Forschungsvorhaben der Transporterpharmakologie widmen, von deren Ergebnissen regionale Unternehmen, die im Bereich der Lebenswissenschaften tätig sind (z.B. pharmazeutische Industrie, Biotechnologie, Wirkstoffprüfung, Tierzucht) profitieren könnten. Es war zudem das erklärte Ziel der Forschergruppe durch Einwerbung zusätzlicher Drittmittel (öffentliche Forschungsprogramme sowie industrielle Fördergelder) weiterführende nichtkommerzielle klinische Studien durchzuführen, um die gewonnenen Ergebnisse aus beiden Modulen möglichst zeitnah einem „*Proof-of-Concept*“ durch tierexperimentelle und klinische Studien zu unterziehen.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Alle direkt beteiligten Projektpartner haben sich bereits vor Durchführung des o.g. InnoProfile-Projekts erfolgreich im BMBF-NBL3-Programm auf dem Gebiet der Transporterpharmakologie wissenschaftlich hervorragend ausgewiesen. Die Forschungsprojekte aus diesem Programm waren vorwiegend grundlagenorientiert, wohingegen sie im Rahmen des InnoProfile-Vorhabens in wirtschaftlich verwertbare Entwicklungen umgesetzt werden sollten. Die Forschergruppe wurde im *Research Center for Pharmacology and Experimental Therapeutics* gebildet, dem die Einrichtungen der Antragsteller angehören, mit Ausnahme der Arbeitsgruppe um Prof. Hosten.

Die vorausgegangenen Forschungsaktivitäten im Rahmen des BMBF-NBL3-Programmes erbrachten folgende projektrelevanten Erkenntnisse über das Anfluten von Arzneistoffen am Ort seiner Wirkung / Nebenwirkung: (1) Der Ort der Arzneistoffliberation wird von Magen-Darmbewegungen beeinflusst, die durch Nahrungsaufnahme gesteuert werden können; (2) Lösungswasser steht im Darm nur begrenzt und diskontinuierlich verteilt zur Verfügung; (3) die intestinale Resorption durch Darmzellen wird von aktiven Transportproteinen kontrolliert, deren Aktivität regional unterschiedlich ausgeprägt ist (es existieren regionale „Absorptionsfenster“ für Transportsubstrate); (4) die zelluläre Nettoaufnahme zu den Wirkorten wird durch die Funktion zellulärer Aufnahme- und Effluxtransporter bestimmt; (5) die Funktion zellulärer Transportproteine ist von genetischen und krankheitsbedingten Faktoren abhängig und durch induzierend und hemmend wirkende Arzneimitteln beeinflussbar.

Die beteiligten Abteilungen verfügten neben der umfangreichen Forschungsexpertise auf den zu beforschenden Gebieten der Transporterpharmakologie und der Pharmazeutischen Technologie / Biopharmazie auch über eine ausreichende personelle Ausstattung (z.B.

techn. Mitarbeiter) sowie eine angemessene Forschungsinfrastruktur zur adäquaten Durchführung des beantragen Projektes (z.B. gut ausgestattetes GLP-zertifiziertes analytisches Labor, S1 & S2-Labore für molekular- und zellbiologische Untersuchungen, Probandenstation zur Durchführung klinischer *Proof-of-Concept*-Studien).

Die räumlichen Arbeitsbedingungen der InnoProfile-Gruppe haben sich mit dem Umzug ins neue C_DAT-Forschungsgebäude im November 2011 noch deutlich verbessert und ermöglichten zudem eine erleichterte Zusammenarbeit der beteiligten Arbeitsgruppen.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Nachwuchsgruppe stellte ein interdisziplinäres Verbundprojekt bestehend aus den Instituten für Allgemeine und Klinische Pharmakologie, der Abteilung für Biopharmazie und Pharmazeutischer Technologie des Pharmazeutischen Instituts sowie dem Zentrum für Radiologie dar und bildete in der Gesamtheit das Kompetenzzentrum C_DAT (*Center of Drug Absorption and Transport*). Somit legte die InnoProfile-Gruppe auch namentlich den Grundstein für das bereits erwähnte interfakultäre C_DAT-Forschungsgebäude, welches während der Projektlaufzeit vom deutschen Wissenschaftsrat als Bau von nationaler Bedeutung befürwortet wurde und der Forschergruppe ab Herbst 2011 eine gemeinsame räumliche Struktur zur Verfügung stellte.

Aufgrund der Interdisziplinarität des Projektes und der sehr unterschiedlichen Fragestellungen, bearbeiteten wir das Forschungsvorhaben in den zwei Modulen (1) Zelluläre Transporter als *Target* neuer Arzneimittelentwicklungen sowie neuer Konzepte zum *Drug Targeting* („**Transportermodelle**“) und (2) Entwicklung neuer Wirkstofffreisetzungs-Systeme („***Drug Delivery*-Systeme**“).

Die sieben Personalstellen unserer Forschergruppen verteilten sich während der gesamten Projektlaufzeit auf fünf Postdocs und vier Doktoranden, wobei sich drei Postdocs und zwei Doktoranden dem Modul „Transportermodelle“ widmeten und dem Forschungsmodul „*Drug Delivery*-Systeme zwei Postdocs und zwei Doktoranden zugeordnet wurden.

Im Teilbereich „Transportermodelle“ sollten (1) neue zelluläre Aufnahme- und Effluxtransporter identifiziert und sowohl molekularbiologisch als auch funktionell in solchen Geweben und Organen charakterisiert werden, die für die Entwicklung neuartiger Konzepte des *Drug Targetings* sowie als Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Arzneimittel geeignet sind, insbesondere im Herzen (Endothelzellen, Kardiomyozyten), in Blutzellen (Thrombozyten) und Entzündungszellen (Makrophagen). Des Weiteren sollten (2) marktfähige zelluläre Modelle für klinisch relevante Transporter und deren funktionell relevanten genetischen Varianten entwickelt werden, um Substrateigenschaften bekannter und neuer Arzneistoffe zu charakterisieren, genetische und nicht-genetische Variabilität beurteilen zu können und Wirkungen potentiell neuer Arzneistoffe möglichst im *high-throughput*-Verfahren prüfen zu können.

Im Detail wurden in diesem Modul folgende Arbeitspakete (AP) bearbeitet:

AP1.1: Entwicklung valider zellulärer Transportermodelle zum Wirkstoffscreening

AP1.2: Entwicklung valider zellulärer Transportermodelle für neue Transporter und genetische Varianten

AP1.3: Entwicklung von Zellmodellen zur Prüfung von Transportervariabilität

AP1.4: Charakterisierung des Arzneimitteltransports in humanen Leberzellen

AP1.5: Arzneimitteltransport in zellulären Mikrokompartimenten (Thrombozyten, Endothelzellen, Kardiomyozyten, Makrophagen).

Im Teilbereich „*Drug Delivery*-Systeme“ sollten neuartige Arzneiformen für bekannte und neue Arzneistoffe entwickelt werden, deren Absorption durch intestinale Transporter limitiert ist (1). Für derartige *Drug Delivery*-Systeme sollten zudem neue *In vitro*-Testverfahren zur Vorhersage des *In vivo*-Freisetzungsverhaltens entwickelt werden (2).

Im Detail wurden in diesem Modul folgende Arbeitspakete (AP) bearbeitet:

AP2.1: Entwicklung eines *In vitro*-Dissolution-Messplatzes

AP2.2: Entwicklung gastroretentiver *Drug Delivery*-Systeme

AP2.3: Entwicklung pulsatiler *Drug Delivery*-Systeme

AP2.4: Entwicklung mukoadhäsiver *Drug Delivery*-Systeme

AP2.5: Entwicklung von *Drug Delivery*-Systemen für das Kolon.

Hierbei wurden folgende projektübergreifende Meilensteine (M) gesetzt, von deren Erreichen die weitere Fortführung nachfolgender Projekte unabdingbar abhängig war:

M1: funktionsfähiger *In vitro*-Dissolution-Messplatz (bis 1. Quartal 2008)

M2: Zellmodelle für pharmakokinetisch relevante Transporter (bis 1. Quartal 2009)

M3: Entwicklung prüffähiger „*Drug Delivery*-Plattform“ (bis 1. Quartal 2010)

M4: Charakterisierung von Transportern in zellulären Mikrokompartimenten (bis 1. Quartal 2011).

Die Greifswalder InnoProfile-Nachwuchsgruppe konnte ihre Forschungstätigkeiten während der gesamten Projektlaufzeit erfolgreich durchführen. Alle Personalstellen waren durchgängig mit fachlich sehr gut geeigneten Mitarbeitern besetzt. Während des Berichtzeitraums haben sich nur geringe personelle Umstrukturierungen ergeben, die hauptsächlich auf das Ausscheiden von Doktoranden nach Abschluss ihrer Promotion zurückzuführen waren. Lediglich ein Postdoc hat die Gruppe während der 5-jährigen Laufzeit verlassen.

1.4 Wissenschaftlicher Stand, an den das Vorhaben angeknüpft hat

Damalige Konzepte zum Transport eines Arzneistoffes zum Wirkort gingen in der Regel von einer kontinuierlichen Gastrointestinalpassage der Arzneiformen, von der Existenz großer Lösungskapazität im Darm (dieser wurde bisher durchgängig als wassergefüllter Schlauch angesehen) sowie von passiver Überwindung der Darmbarriere und Verteilung an den Wirkort aus. In diesen Konzepten wurde das Anfluten eines Wirkstoffs allein als Folge seiner physikochemischen Eigenschaften betrachtet. Sie bilden allerdings die physiologische Wirklichkeit falsch ab und lassen die oben genannten Erkenntnisse über die Bedeutung der Motilität und des Wasserhaushaltes des Darmes sowie die Rolle aktiver Transportproteine auf dem Weg der Arzneistoffe zum Wirkort vollständig unberücksichtigt.
Deshalb waren neue Konzepte, Methoden und Verfahren in der vorklinischen und klinischen Erprobung sowie in der pharmazeutischen Herstellung (Galenik) bereits bekannter sowie neuer Arzneimittel dringend geboten, in denen diese neuen Erkenntnisse berücksichtigt werden. Wesentliche Vorleistungen der beteiligten Arbeitsgruppen wurden bereits im Vorfeld des InnoProfile-Vorhabens erbracht (siehe 1.2).

Transportermodelle: Vor Projektbeginn war bereits eine Vielzahl von Arzneimitteltransportern bekannt, die jedoch nur in unterschiedlichem Ausmaß charakterisiert waren. Vielfach wurde auch mit Modellen gearbeitet, deren Grundlage Oozyten vom Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) waren und somit nicht annähernd die Bedingungen von Säugerzellen abbilden (König et al., Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2006;372: 432; Kullak-Ublick et al. Gastroenterology. 2001;120:525; Su Y et al. Mol Pharm. 2004;1:49; Abe et al. Gastroenterology. 2001;120:1689). Da Transporterproteine die Aufnahme oder den Efflux von zahlreichen endogenen oder exogenen Substanzen vermitteln und somit eine zentrale Rolle bei der Absorption, Biotransformation, Verteilung und Ausscheidung von Arzneimittel spielen, ist es im Rahmen der Arzneimittelentwicklung von großer Bedeutung diese Prozesse für einen entsprechenden Arzneistoff genau zu kennen (Schwarz et al., Clin Pharmacol Ther. 1999;65:283).

Hierfür existierten für die meisten relevanten Arzneimitteltransporter bereits überexprimierende zelluläre Modellsysteme, die zumeist die erstbeschreibenden Arbeitsgruppen generiert haben (z.B. Yamashiro et al., Drug Metab Dispos. 2006;34:1247; Luo et al., Mol Pharm. 2006;3:329; Maeda et al., Mol Pharm. 2006;3:70). Da solche Modelle aber primär für die Erforschung grundlagenwissenschaftlicher Fragen dienten, unterblieb regelmäßig die Charakterisierung dieser Systeme im Hinblick auf Robustheit, Konstanz der Ergebnisse etc. Eine derartige Validierung der Modelle, wie sie für andere pharmazeutisch-pharmakologische Anwendungen bereits fest etabliert ist, ist aber nötig, um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse generieren zu können. Zudem existierten keine einheitlichen Zellsysteme, bei denen unterschiedliche humane Transporter aus den gleichen Ursprungszellen generiert wurden. Weiterhin existierten nur vereinzelte Zellmodelle für funktionell bedeutsame genetische Varianten von Transporterproteinen, die zumeist auch keine stabilen Zellsysteme darstellten (sog. transient-transfizierte Zellen) und sich somit nicht für den Routinebetrieb eigneten (Smith et al., Clin Pharmacol Ther. 2007;81:76; Badagnani et al., J Pharmacol Exp Ther. 2006; 318:521).

Somit stellte geplante die Entwicklung und Validierung einer umfangreichen zellulären Transporterplattform unter Berücksichtigung der klinisch relevanten Transporter und deren genetischen Varianten in einheitlichen Zelllinien eine notwendige Grundvoraussetzung für die valide Charakterisierung von Transporteraffinitäten dar, die es zum damaligen Zeitpunkt weltweit nicht gab.

In Bezug auf die Expression von Transporterproteinen in klinisch bedeutsamen Zielkompartimenten der Arzneimitteltherapie konnten wir und andere zeigen, dass zahlreiche Transportproteine auch im Herzen zu finden sind, wie die der Effluxtransporter ABCB1, das *breast cancer resistance protein* (BCRP) und das *multidrug resistance protein* (MRP5) (Meissner et al., J Histochem Cytochem. 2002;50:1351; Meissner et al., Shock. 2007;28:564; Meissner et al., J Histochem Cytochem. 2006;54:215; Dazert et al., Am J Pathol. 2003;163:1567). Ihre Expression unterliegt krankheitsbedingten Veränderungen, welches möglicherweise therapeutische Implikationen hat. Zudem konnten wir kardiale Aufnahmetransporter identifizieren wie den endothelialen OCTN2, ein Carrier für das physiologische wichtige Carnitin. Auch dieser unterliegt krankheitsbedingten Veränderungen, was möglicherweise Relevanz für die kardiale Aufnahme von Arzneimitteln (z.B. Aldosteronrezeptorantagonisten und Kalziumkanalblockern) hat. Ein weiterer im Herzen lokalisierter Transporter ist das OATP2B1, welches die selektive zelluläre Aufnahme des bedeutsamen Herz-Kreislauf-Medikaments Atorvastatin vermittelt (Grube et al., Clin Pharmacol Ther. 2006; 80:607). Diese vielversprechenden Vorarbeiten sollten im InnoProfile-Projekt deutlich erweitert werden.

Peripheren Blutzellen, insbesondere Thrombozyten kommt in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen eine Schlüsselstellung zu. In Thrombozyten konnten wir ABCC4 als hochaffinen Transporter für ADP identifizieren, welches eine Schlüsselrolle in der Thrombozytenfunktion einnimmt und sich möglicherweise als zukünftige Zielstruktur für eine Arzneimitteltherapie eignet (Köck et al., Clin Pharmacokinet. 2007;46:449). Zur abschließenden Beurteilung der genannten Vorgänge, müssen jedoch weitere, umfangreichere Expressionsanalysen und weiterführende funktionelle Prüfungen durchgeführt werden.

Ein weiteres interessantes Mikrokompartiment, in dem Transportproteine von pharmakologischer Bedeutung sein könnten, sind Entzündungszellen, insbesondere Makrophagen. Von Makrophagen ist bekannt, dass sie einerseits in Entzündungsgebiete einwandern können. Sie selbst können aber auch der Ort sein, in dem bestimmte Bakterien persistieren und chronische Prozesse unterhalten. Andererseits sind Makrophagen Zellen, in denen sich bestimmte Antibiotika um das Mehrfache der Serumkonzentration anreichern können (Conte et al., Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:334). Die Anreicherung von Arzneistoffen (z.B. Makrolidantibiotika) in Makrophagen ist nicht allein durch physikochemische Prozesse („Basentrapping“) erklärbar, sondern es sind offensichtlich aktive Aufnahmetransporter beteiligt. Unumstritten ist, dass die Auswärtstransporter ABCB1

und MRP2, die auch Makrolide transportieren können, in Makrophagen exprimiert werden (Chan et al., Eur J Pharm Sci. 2004;21:25; Bosquillon et al., J Pharm Sci 2010;99:2240). Die Nettoaufnahme bestimmter Antibiotika in Makrophagen scheinen das Ergebnis des Wechselspiels zwischen Aufnahme- und Auswärtstransport zu sein. Wenn man diese Vorgänge besser verstehen würde, könnte man beispielsweise die Beladung der Makrophagen mit Antibiotika durch medikamentöse Modulation der Auswärtstransporter erhöhen und die Effektivität der antimikrobiellen Therapie steigern. Weiterführende Forschungsarbeiten in diesem Gebiet versprechen somit tiefere Einblicke in bekannte Therapieprinzipien und ermöglichen ggf. eine Optimierung bestehender Strategien.

***Drug Delivery*-Systeme:** Die orale Bioverfügbarkeit einer Vielzahl von Arzneistoffen wird durch Transportersysteme des Gastrointestinaltraktes limitiert, wie den *multidrug* Effluxtransportern P-Glykoprotein (P-gp, ABCB1) und MRP2 (z.B. Dietrich et al., Gut 2003;52:1788; Oswald et al., Clin Pharmacol Ther. 2006;79:206; Haenisch et al., Pharmacogenet Genomics. 2008;18:357). Die betroffenen Arzneistoffe zeigen nach oraler Applikation eine zumeist geringe und hoch variable Bioverfügbarkeit. Darüber hinaus wird die Absorptionsrate von Arzneistoffen mit transporterlimitierter Absorption häufig auch durch eine zeitnahe Nahrungsaufnahme erheblich beeinflusst („*Food Effect*"). Die Effektivität der oralen Therapie mit diesen Arzneistoffen wird dadurch limitiert. Des Weiteren steigt auch das Risiko von unerwünschten Wirkungen an. Ein weiterer komplizierender Faktor der intestinalen Arzneistoffabsorption stellt die Tatsache dar, dass die Expression von Transportern und Metabolisierungsenzymen entlang des Darms offenbar nicht gleichmäßig ist, sondern funktionelle „Absorptionsfenster" für Substrate dieser Enzyme oder Transporter zu bestehen scheinen (Zimmermann et al., Drug Metab Dispos. 2005;33:219, Englund et al., Eur J Pharm Sci. 2006;29:269, Drozdzik et al., Clin Pharmacol Ther. 2012; 91:50). Folglich ist die Aufnahme aus dem Darmlumen ganz entscheidend davon abhängig, in welchem Darmabschnitt der Arzneistoff durch die Darreichungsform freigesetzt wird.

Um unerwünschten Effekten vorzubeugen und die erwünschte Wirkung möglichst zuverlässig zu erreichen, müssen Arzneistoffe mit entsprechenden Eigenschaften in der Regel mehrmals täglich nach streng einzuhaltenden Regeln eingenommen werden. Dies erfordert eine erhebliche Kooperationswilligkeit und insbesondere auch Kooperationsfähigkeit der Patienten, die in der Praxis häufig nicht gegeben ist (mangelhafte „Compliance").

Aus den genannten Gründen arbeiten finanzstarke forschende Arzneimittelkonzerne nicht nur an neuartigen Arzneistoffen, sondern mit großem Nachdruck auch an neuen *Drug Delivery*-Systemen, die durch spezielle technologische Maßnahmen („Galenik") den zeitlichen und örtlichen Verlauf der Arzneistofffreisetzung im Gastrointestinaltrakt steuern, um (1) das Ausmaß der Arzneistoffabsorption zu erhöhen, (2) die Variabilität der Aufnahme zu senken, (3) die Einnahmehäufigkeit zu vermindern und (4) *Food*-Effekte zu überwinden (Dietrich et al., Gut 2003;52:1788; Singh, Clin. Pharmacokinet. 1999;37:213).

Zur Prädiktion des Freisetzungsverhaltens eines *Drug Delivery*-Systems ist die Entwicklung von *In vitro*-Prüfsystemen notwendig, die die physiologischen Bedingungen im Magen-Darmtrakt realistischer simulieren als die üblicherweise dafür verwendeten Testverfahren. Hierbei wurde häufig die statische Blattrührer-Freisetzungsapparatur nach dem Europäischen bzw. Amerikanischen Arzneibuch verwendet. Dieses System ist jedoch lediglich dazu geeignet die Reproduzierbarkeit der Freisetzung einer Arzneiform (Chargenhomogenität) zu prüfen und hat keinerlei Bezug zur physiologischen Realität. Der Bedarf an physiologisch basierten Testverfahren ist bereits beschrieben worden und insbesondere auf dem Gebiet der biorelevanten Medien waren erste Innovationen erfolgt (Khan, Int. J. Pharm. 1996;140:131; Dressman et al., Pharm. Res. 1998;15:11). Physiologie-basierte Freisetzungssyteme waren vor Projektbeginn jedoch nicht verfügbar.

Die Arbeitsgruppen Weitschies und Siegmund besitzen eine anerkannte Kompetenz in den Themenfeldern der pharmazeutisch-technologischen Entwicklung neuer Arzneiformen sowie der biopharmazeutischen, tierexperimentellen und humanpharmakologischen Charakterisierung von Arzneimitteln. Dies dokumentiert sich neben gemeinsamen

Publikationen und Patentanmeldungen aus den beiden Arbeitsgruppen auch in der im Jahr 2005 erfolgten Gründung einer Greifswalder Betriebsstätte der LTS Lohmann Therapiesysteme AG, dem weltweit führenden Hersteller von transdermalen therapeutischen Systemen („TTS"). Diese Gründung erfolgte mit dem Ziel, durch Kooperation mit den beiden Arbeitsgruppen Zugang zu Schlüsseltechnologien der oralen Arzneimitteltherapie zu erhalten und damit das Geschäftsfeld zukünftig um orale therapeutische Systeme zu erweitern.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Unsere InnoProfile-Nachwuchsgruppe stellte ein interfakultäres Verbundprojekt bestehend aus Instituten der Medizinischen und Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität dar und war demgemäß eingebettet in die Strukturen der Universität Greifswald einerseits und die der Universitätsmedizin andererseits.
In diesem Zusammenhang bestanden zahleiche Interaktionen mit anderen forschungsnahen Instituten der Universität / des Klinikums (z.B. Institut für Anatomie und Zellbiologie, Institut für medizinische Mikrobiologie, Institut für Pathologie, Institut für Transfusionsmedizin, Institut für Physiologie und Abteilung für Kardiologie). Durch den intensiven Kontakt zu den genannten Instituten ergab sich für die Gruppe die Einbindung in ein komplexes Wissensnetzwerk und ermöglichte die gegenseitige Nutzung der bestehenden Forschungsinfrastruktur (z.B. diverse Großgeräte wie Fluoreszenzmikroskop oder NMR-LC-MS-System) bzw. des existierenden experimentellen *Know-Hows*. Zudem kooperierte unser InnoProfile-Projekt mit nachfolgenden Verbundprojekten der Universität zu folgenden Inhalten:

- Zentrum für Innovationskompetenz-Funktionelle Genomforschung (BMBF): Nutzung der im ZIK-FunGene entwickelten Proteom-Technologien zur Charakterisierung der Expression von Membrantransportern.
- Inflammatorische Kardiomyopathie, SFB-TR19 (DFG): Native Expression und krankheitsbedingte Variabilität zellulärer Transporter.
- SHIP-Studie (BMBF, Land M-V, Siemens): Genetische und epigenetiche Variabilität von Transportern.
- BMBF-Initiative „Biotechnologie – Chancen nutzen und gestalten" im Greifswalder Vorhaben „Validierung der Magnetresonanztomographie zur Reduktion der Zahl und Belastung von Versuchstieren in der medizinischen Grundlagenforschung", Teilvorhaben „Visualisierung und funktionelle Charakterisierung des Absorptionsweges von Arzneimitteln mittels MRT-Kontrastmittel": Weiterführende tierexperimentelle Studien über unsere *In vitro*-Befunde der Kontrastmittel-Forschung

In Ergänzung zu den genannten Kooperationen bestanden auch enge Beziehungen zu den folgenden externen Forschungsgruppen / industriellen Partnern:

- Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universität Erlangen-Nürnberg
- Institut für Pharmakologie der Christian-Albrechts Universität zu Kiel
- Abteilung für Klinische Chemie und Pharmakologie der Universität Bonn
- Bayer Health Care AG, Berlin
- MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar
- Dr. Pfleger GmbH, Bamberg
- Prof. Bruno Stieger vom Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsspitals Zürich
- Pfizer Inc., Dept. Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Groton, CT, USA
- AstraZeneca R&D, Medicines Evaluation, Pharmaceutical Development and DMPK, Mölndal, Sweden

- University of Washington, Department of Pharmaceutics, Seattle, WA, USA
- Division of Clinical Pharmacology, School of Medicine, Indiana University, Indianapolis, IN, USA
- Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan
- Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow.

Des Weiteren führten die von unserer Gruppe entwickelten *In vitro*-Modelle zur Vernetzung mit folgenden nationalen und internationalen Gruppen: Prof. Anna Seelig, Universität Basel, Schweiz; Prof. Martin Fussenegger, ETH Zürich, Schweiz; Prof. James E. Polli, Universität Maryland, USA; Prof. Jaques Turgeon, Centre Hospitalier de L'Université de Montreal, Québec, Kanada und Prof. Alfred H. Schinkel, The Stichting Het Nederlands Kanker Institut, Niederlande.

2. Eingehende Darstellung

2.1 Verwendung der Zuwendung, erzielte Ergebnisse und Notwendigkeit der geleisteten Arbeit

Die wissenschaftliche Arbeit unserer Forschergruppe gestaltete sich während des gesamten Projektzeitraums sehr erfolgreich. Die nachfolgende Zusammenfassung der erzielten Forschungsergebnisse gliedert sich in die Module (1) Zelluläre Transporter als *Target* neuer Arzneimittelentwicklungen sowie neuer Konzepte zum *Drug Targeting* („**Transportermodelle**“) und (2) Entwicklung neuer Wirkstofffreisetzungs-Systeme („***Drug Delivery*-Systeme**“) und stellt die Projektleistungen den gesetzten Arbeitszielen (Arbeitspakete, Meilensteine) gegenüber.

Im Modul **„Transportermodelle**“ wurden den **Arbeitspaketen 1.1 und 1.2** entsprechend erfolgreich zelluläre Transportermodelle für nahezu alle klinisch relevanten Aufnahme- und Efflux-Transporter und deren funktionell bedeutsamen genetischen Varianten entwickelt, umfangreich charakterisiert und funktionell validiert. Alle Zellmodelle wurden in einheitlichen Zelllinien erstellt (HEK293, MDCKII) und einheitlich nach C_DAT-internen Standardverfahren validiert. Hierbei wurde in Anlehnung an andere industrielle Standards wie GLP (*Good Laboratory Practice)* und GCP (*Good Clinical Practice)* ein internes GCCP (*Good Cell Culture Practice*)-Konzept entwickelt. Demgemäß wurden jeweils unter anderem die Expression des entsprechenden Transporters auf mRNA- und Proteinebene sichergestellt, die zelluläre Lokalisation des Zielproteins abgeklärt und die Funktionalität der Zellmodelle mit jeweils zwei etablierten Standardsubstraten und zwei Standard-Inhibitoren charakterisiert wie exemplarisch für die Zelllinie HEK-OATP2B1 in Abb. 1 gezeigt wird (vollständige Charakteristika in den Tabellen 1 und 2).

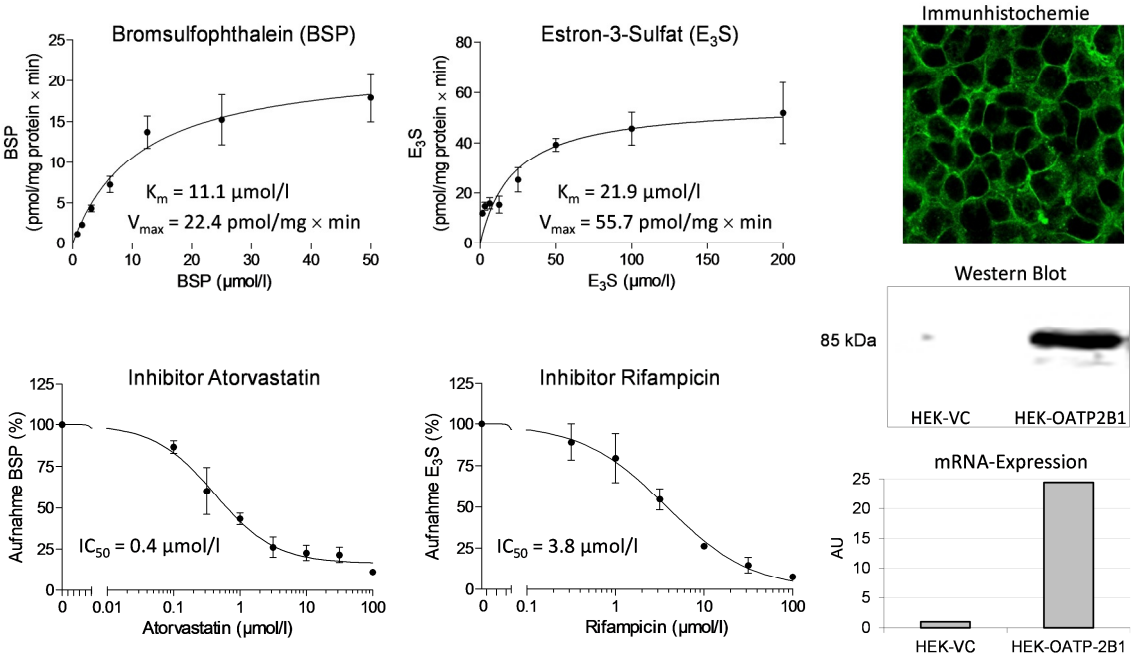


Abb. 1: Validierung der HEK-OATP2B1-Zelllinie mittels Immunohistochemie, Western-Blot- und mRNA-Quantifizierung sowie Funktionsassays mit zwei Standardsubstraten und zwei Standardinhibitoren

Tabelle 1: Entwickelte zelluläre Transportermodelle für pharmakokinetisch relevante Transporter und deren funktionell bedeutsame genetische Varianten, die in HEK293- sowie MDCKII-Zellen transfiziert worden sind

HEK293-Zellen		MDCKII-Zellen	
OATP1A2	*1	OATP1A2	*1
	*2		*2
	*3		*3
OATP1B1	*1a	OATP1B1	*1a
	*1b		*1b
	*5		*5
	*15		*15
OATP1B3	WT	OATP1B3	WT
	c.334T>G		
	c.699G>A		
	c.1564G>T		
	c.334T>G +		
OATP2B1	WT	OATP2B1	WT
	c.601G>A		c.601G>A
	c.995G>A		c.995G>A
	c.1457C>T		c.1457C>T
OATP1C1			
OATP3A1		OATP3A1	
OATP4A1		OATP4A1	
OATP4C1		OATP4C1	
OCT1			
OCT2			
OCT3			
OCTN2		OCTN2	
NTCP		NTCP	
ASBT		ASBT	
ABCB1		ABCB1	
ABCC2		ABCC2	

Tabelle 2: Funktionelle Charakteristika der zellulären Transportermodelle in HEK293-Zellen

Transporter	Substrate	Inhibitor	K_m (µmol/l)	V_{max} (pmol/mg × min)	IC_{50} (µmol/l)
OATP1A2	Estron-3-Sulfat	Naringin	32.0 ± 5.9	36.6 ± 1.7	21.3 ± 1.3
	Estron-3-Sulfat	Fexofenadin			77.9 ± 1.1
	Taurocholat		117.5 ± 16.5	25 ± 1.2	
***2**	Estron-3-Sulfat	Naringin	4.3 ± 6.8	3.5 ± 0.8	19.2 ± 1.3
	Estron-3-Sulfat	Fexofenadin			136.2 ± 1.1
	Taurocholat		64.3 ± 21.8	4.8 ± 0.5	
***3**	Estron-3-Sulfat	Naringin	4.0 ± 2.8	7.4 ± 0.7	27.1 ± 1.2
	Estron-3-Sulfat	Fexofenadin			65.9 ± 1.1
	Taurocholat		20.2 ± 5.8	3.6 ± 0.2	
OATP1B1	BSP	Rifampicn	1.2 ± 0.2	21.3 ± 0.7	11.7 ± 1.1
***1b**	BSP	Rifampicn	2.1 ± 0.3	31.8 ± 1.6	15.3 ± 1.1
***5**	BSP	Rifampicn	2.5 ± 0.2	40.7 ± 1.1	20.7 ± 1.1
***15**	BSP	Rifampicn	0.4 ± 0.1	7.5 ± 0.5	21 ± 1.1
OATP1B3	BSP	Rifampicin	1.0 ± 0.4	11.3 ± 1.0	1.1 ± 1.1
T334G	BSP	Rifampicin	12.06 ± 5.3	11.4 ± 2.4	0.8 ± 1.3
G699A	BSP	Rifampicin	6.4 ± 1.1	37.1 ± 2.4	1.6 ± 1.1
G1564T	BSP	Rifampicin	-	1.3 ± 0.3	3.2 ± 1.1
T334G, G699A	BSP	Rifampicin	4.4 ± 0.5	25.2 ± 1.0	6.5 ± 1.5
OATP2B1	BSP	Rifampicin	11.1 ± 3.9	22.4 ± 2.9	80.5 ± 1.1
OCT1	MPP^+	Verapamil	501 ± 384	15.5 ± 8.6	8.2 ± 4.7
OCT2	MPP^+	Verapamil	220 ± 81	101.3 ± 21.6	31.5 ± 2.5
NTCP	Taurocholat	BSP	22.1 ± 1.9	103.0 ± 4.2	8.8 ± 1.3

Mit diesen Zellmodellen sind alle international akzeptierten Assays zur *In vitro*-Charakterisierung der Transporteigenschaften (Affinität, Inhibition) von Arzneistoffen und anderen Xenobiotika möglich (Transwell™, Lipovesikelassays, Uptake-Assays, Kompetitionsassays, Regulationsstudien etc.) und an Demonstrator-Arzneimitteln (*probe drugs*) erprobt worden. Diese validen Transportermodelle ermöglichten uns während des gesamten Projektzeitraums die Charakterisierung der Transporteraffinität von neuen oder bereits etablierten Arzneistoffen. Nachfolgend sind wesentliche Projekte genannt, in denen die Zellmodelle zum Einsatz kamen:

- Charakterisierung der bisher unklaren Mechanismen der hepatischen Aufnahme des häufig eingesetzten Cholesterol-senkenden Arzneistoffes Ezetimib (Ezetrol® bzw. Inegy®) über leberspezifische Transporter der OATP-Familie (OATP1B1, OATP1B3 und OATP2B1) und Aufklärung der klinischen Bedeutung von genetischen Polymorphismen des OATP1B1-Transporters für die Pharmakokinetik und Wirksamkeit des Stoffes (Oswald et al., Pharmacogenetics and Genomics 2008,18:559).
- Charakterisierung der hepatischen und intestinalen Aufnahmeprozesse des MRT-Kontrastmittels Primovist (Gd-EOB-DTPA) und Aufklärung der klinischen Bedeutung genetischer Varianten (Leonhardt et al., Drug Metab Dispos 2010, 38:1024; Jia et al., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2012, 891-892:20; Nassif et al., Radiology 2012, 264:741; Jia et al. Mol Pharm 2012, under revision). Es konnte gezeigt werden, dass die Transporter OATP1B1, OATP1B3, NTCP, ABCC2 und ABCC3 in die Pharmakokinetik und Gewebeverteilung des Kontrastmittels eingebunden sind.
- Untersuchungen zur Affinität und Hemmwirkung der Immunsuppressiva Sirolimus und Tacrolimus auf die Transporter ABCB1, ABCC2, OATP1B1 und OATP1B3 zur Abschätzung des Interaktionspotentials des Arzneistoffes Ezetimib mit den genannten Immunsuppressiva (Oswald et al., Clin Pharmacol Ther 2010, 87:663 und 2011, 89:524).
- Untersuchungen zur Affinität und Hemmwirkung des HIV-Therapeutikums Efavirenz auf die Transporter ABCB1, ABCC2 und OATP1B1 und Charakterisierung der etwaigen Induktion von Metabolisierungsenzymen und Transportern zur Beurteilung des Interaktionspotentials der Verbindung mit anderen Arzneistoffen (Oswald et al., Clin Pharmacol Ther 2012, 91:506).
- Untersuchungen zum Einfluss der pharmazeutischen Hilfsstoffe PEG400, Solutol, HPCD und Cremophor EL auf die Funktion der Aufnahmetransporter OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1 und NTCP und die Effluxtransporter ABCB1 und ABCC2. Hierbei zeigte sich der Lösungsvermittler PEG400 als spezifischer OATP1A2 Hemmstoff (Hanke et al., Eur J Pharm Biopharm 2010;76:260; Engel et al., Mol Pharm 2012;9:2577).
- Charakterisierung der Affinität und des inhibitorischen Potentials von Makrolid-Antibiotika zu Aufnahmetransportern. Hierbei wurde beispielsweise deutlich, dass intestinal (OATP1A2, OATP2B1) und hepatisch (OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1) exprimierte Aufnahmetransporter durch das Antibiotikum Clarithromycin zwar inhibiert werden, nicht jedoch als Transporter fungieren (Peters et al., Drug Metab Dispos. 2012; 40:522).
- Charakterisierung der OATP-vermittelten Aufnahme von Phenprocoumon (Manuskript wird derzeit erstellt).
- Charakterisierung der zellulären Aufnahmemechanismen des Blasenspasmolytikums Trospiumchlorid durch OCT1, OATP1A2 und ABCB1 für die intestinale und urotheliale Aufnahme des Arzneistoffs (Kooperationsprojekt mit Dr. Pfleger GmbH, Manuskript wird erstellt).

- Bestimmung der Affinitätsdaten von Talinolol, Ezetimib und Propiverin zu einer Vielzahl von Aufnahme und Effluxtransportern (z.B. OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, NTPC, ABCB1 und ABCC2).
- Charakterisierung des Substratspektrums und der Regulation von OATPs. Hierbei konnte beispielsweise gezeigt werden, dass in Gegenwart von Progesteron der OATP2B1-vermittelte Transport von sulfatierten Verbindungen wie Pregnenolonsulfat gesteigert bzw. physiologisch überhaupt erst ermöglicht wird (Niessen et al., Drug Metab Dispos 2009, 37:1129; Koenen et al., Eur J Pharm Sci 2012;47:774).
- Untersuchung zur zellulären Aufnahme von Valsartan durch Arzneimitteltransporter.

Der Austausch dieser Zellmodelle mit anderen Forschergruppen ist bereits ein wichtiges Instrument der nationalen und internationalen Vernetzung der InnoProfile-Gruppe geworden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Universitären und industriellen Arbeitsgruppen, die mit *In vitro*-Zellmodellen der InnoProfile-Gruppe arbeiten

Arbeitsgruppe	Universität / Firma
Anna Seelig	Universität Basel, Schweiz
Ralf Ehret	Bionas GmbH, Rostock, Deutschland
Martin Fussenegger	Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Schweiz
James E. Polli	University of Maryland, U.S.A.
Jacques Turgeon	Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Kanada
Jashvant Unadkat	University of Washington, U.S.A.
Alfred H. Schinkel	The Stichting Het Nederlands Kanker Institut, Niederlande
Martin Fromm	Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, Deutschland

Durch Nutzung unserer Zellsysteme konnte u. a. gezeigt werden, dass einige in Pflanzen vorkommenden Flavonoide *in vitro* einen hemmenden Einfluss auf den Aufnahmetransporter OATP1A2 aufweisen bzw. die Aufnahmetransporter OATP1A2 und OATP4C1 keine Bedeutung für den Transport des entzündungshemmenden Wirkstoffes Mesalazin besitzen (Mandery et al., Biochem Pharmacol. 2010; 80:1746; König et al., Drug Metab Dispos. 2011; 39:1097). Eine kanadische Arbeitsgruppe konnte anhand eines unserer Zellmodelle zeigen, dass die β-Blocker Celiprolol, Nadolol und Propranolol einen inhibitorischen Effekt auf den Aufnahmetransporter OATP1A2 ausüben (Li et al., Clin Pharmacol Ther. 2012; 91:60; Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Kanada).

Die Entwicklung der dargestellten Zellmodelle stellte den zweiten Projektmeilenstein „Zellmodelle für relevante Transporter" dar und konnte mit leichter Verspätung im Sommer 2009 erreicht werden. Die Weiterentwicklung der Zellplattform um weitere Transporter und deren genetischen Varianten versteht sich als kontinuierlicher Prozess.

Im Zusammenhang mit den geplanten Untersuchungen zur Regulation von Transportergenen als Ursache von Transportervariabilität (**Arbeitspaket 1.3**) konzentrierte sich unsere Gruppe insbesondere auf die genetische und epigenetische Regulation. Derartige Regulationsprozesse verursachen mitunter eine große interindividuelle bzw. gewebespezifische Variabilität in der Expression und Funktion der resultierenden Proteine. Die Ursachen dieser Variabilität sind vielfältig. Zum einen können genetische Variationen im Regulationsbereich des Gens zu einer veränderten Expression führen, zum anderen gibt es so genannte epigenetische Mechanismen (z.B. die Methylierung des Regulationsbereichs

eines Gens), welche die Expression und Funktion des resultierenden Proteins maßgeblich beeinflussen können. Bedingt durch derartige genetische Variation bzw. epigenetische Mechanismen kann im Extremfall die gleiche Dosis eines Arzneimittels bei verschiedenen Menschen zu einem stark abweichenden Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil führen. Es ist daher sowohl für die Anwendung bereits bestehender als auch bei der Entwicklung neuer Arzneimittel von besonderem Interesse, die Wirkung solcher individuellen Unterschiede zu kennen. Wir haben daher begonnen, Methylierungsstellen in den bedeutsamen Arzneimitteltransportern ABCB1 und ABCG2 zu identifizieren.

Epigenetische Regulatoren wie die Methylierung von CpG-Inseln in Promotoren sind ein wichtiger gewebespezifischer Regulator der Expression von Transportproteinen. Im ersten Schritt unserer Untersuchungen wurden daher derartige Methylierungsstellen im Promotorbereich der Transportgene identifiziert. Mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden konnte die CpG – Methylierung initial nur qualitativ erfasst werden.
Im Rahmen einer Diplomarbeit konnten wir eine neue Methode zur Quantifizierung der Methylierung von CpG Inseln mittels Pyrosequencing etablieren. Mit Hilfe dieser quantitativen Methode wurde die Methylierung von CpG Inseln in den Promotoren von ABCB1 bzw. ABCG2 in unterschiedlichen Geweben (z.B. Glioblastomen) untersucht. Das entsprechende Probenmaterial für die genannten Untersuchungen wurde uns von der Greifswalder Abteilung für Neurochirurgie zur Verfügung gestellt. Wir untersuchten nachfolgend, ob ein Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben von Gliom-Patienten und dem Methylierungsgrad der angegebenen Gene existiert. Für alle untersuchten Gene zeigte sich jedoch kein signifikanter Einfluss des Methylierungsgrads auf das Gesamtüberleben.

Weiterführende Arbeiten untersuchten die Methylierung der Aufnahmetransporter OATP1A2, OATP1B1, OATP2B1, OATP1B3, OATP3A1, OATP4A1, OATP6A1, SLC6A4, OATP4C1, OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1, OCTN2 sowie GLUT9. Im Promotorbereich folgender Gene wurden CpG-Inseln als mögliche Variablen der Transporterexpression detektiert: OATP1A2, OATP3A1, OATP1B3, OATP4A1, SERT, OCT2 und GLUT9. Nachfolgende Untersuchungen für das vorwiegend in der Niere exprimierte OCT2 bezüglich Expression und Methylierungsgrad anhand des Vergleichs von gesundem Nierengewebe und Tumorgewebe zeigten, dass OCT2 im gesunden Gewebe signifikant stärker exprimiert wird als im Tumorgewebe. Der OCT2-Promotor ist im Tumorgewebe offenbar stärker methyliert und führt folglich zu einer geringeren Genexpression.
Eine direkte Korrelation zwischen Methylierungsgrad und Expression war anhand der bisher untersuchten Proben jedoch nicht feststellbar. Auch beim vorwiegend in der Leber exprimierten OATP1B3 zeigten sich Unterschiede im Methylierungsgrad des Promotors bei Lebern verschiedener Spender, die sich jedoch nicht mit veränderter Expression bzw. bestehenden Pathologien in Einklang bringen ließen. Des Weiteren wurde die Methylierung des Promotors von SERT, einem von uns bisher noch nicht gut charakterisierten Serotonintransporter, im Blut psychiatrischer Patienten analysiert. Dabei wurde der Methylierungsgrad bei Proben gesunder Probanden mit Proben von Patienten mit verschiedenen psychischen Erkrankungen (z.B. Depression, Schizophrenie) verglichen. Entgegen unserer Erwartungen konnten wir jedoch auch hier keinen signifikanten Zusammenhang erkennen.

Die Untersuchungen zur epigenetischen Regulation von Transporterproteinen wurden aufgrund der bisher wenig überzeugenden Ergebnisse und des Ausscheidens des verantwortlichen Mitarbeiters mit der entsprechenden Forschungsexpertise (Dr. C. Rimmbach) nicht weiter fortgeführt. Die zudem in diesem Arbeitspaket geplante Entwicklung von zellulären *knock-down*-Systemen konnte aufgrund des plötzlichen gesundheitsbedingten Ausscheidens des verantwortlichen Gruppenleiters Prof. Dr. Dieter Rosskopf aus dem Berufsleben in der Anfangsphase des Projektes (2009) nicht realisiert werden.

Erfolgreicher liefen unsere Forschungsaktivitäten im Zusammenhang mit der Untersuchung genetischer Transportervariabilität. Wie bereits in Arbeitspaket 1.2 angeführt konnten wir zeigen, dass die hepatische Aufnahme des häufig verordneten Lipidsenkers Ezetimib (Ezetrol®) über das leberspezifische Transportprotein OATP1B1 vermittelt wird und dass Träger der genetischen Varianten *5 und *1b eine geringere hepatische Aufnahme des Arzneistoffes wie eine erhöhte systemische Arzneistoffexposition aufweisen. Somit konnten wir einen ersten Erklärungsansatz für die großen inter-individuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik und Wirkung dieses Arzneimittels liefern (Oswald et al., Pharmacogenetics and Genomics 2008,18:559). Ein weiteres Beispiel stellt das ebenfalls bereits eingangs erwähnte Leberkontrastmittel Gadoxetat dar, welches über die leberspezifischen Aufnahmetransporter OATP1B1, OATP1B3 und NTCP in die Leberzellen aufgenommen wird. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass durch das Vorhandensein der genetischen Variante OATP1B1*5 die Aufnahme des Kontrastmittels signifikant reduziert wurde. Die *in vitro* erhobenen Daten konnten in einer anschließenden klinischen Studie an gesunden Probanden verifiziert werden, bei denen Probanden mit der Variante OATP1B1*5 ebenfalls eine signifikant verminderte hepatische Anreicherung des Kontrastmittels aufwiesen (Nassif et al., Radiology. 2012; 264:741).

Ein weiteres Beispiel stellt der Harnsäuretransporter GLUT9 (*SLC2A9*) dar. Zahlreiche Arzneimittel können mit der Bildung und Transporter-vermittelten Ausscheidung von Harnsäure interferieren. Aus diesem Grund können derartige Stoffe auch akute Gichtanfälle auslösen. Im Rahmen eines nationalen Konsortiums konnten wir einen neuen Harnsäuretransporter identifizieren (GLUT9), dessen genetische Varianten mit dem Blutharnsäurespiegel korrelieren. Die entsprechenden Ergebnisse konnten hochrangig publiziert werden (Döring et al., Nature Genetics 2008, 40:430). Als Untersuchungsbasis griffen wir hierbei auf die Population der *Study of Health in Pomerania* (SHIP)-Studie, einer bevölkerungsbasierten Querschnittsstudie zur Volksgesundheit in Vorpommern mit ca. 4300 eingeschlossenen Probanden, zurück.

Neben umweltbedingten und genetischen Faktoren können auch microRNAs (miRNAs) die Regulation von Transportern und Enzymen möglicherweise maßgeblich beeinflussen. MicroRNAs sind kurze (ca. 20 Nukleotide), nicht kodierende und hoch konservierte RNA-Stränge, die eine wichtige Rolle bei der Genregulation, insbesondere beim sogenannten *gene-silencing* spielen. In einem aktuellen Teilvorhaben mit dem KMU-Partner PRIMACYT wurde die miRNA-Expression in primären Hepatozyten untersucht, wobei der Fokus auf der möglichen Beeinflussung des miRNA Profils durch die Wirkstoffe Atorvastatin und Efavirenz lag. In dem Projekt konnte bislang die Expression von 365 miRNAs mittels der Microarray Technologie (TaqMan® microRNA Low-Density-Arrays) erfolgen. Bei der Auswertung standen zunächst die durch Atorvastatin regulierten miRNAs im Vordergrund, die zurzeit validiert werden und für die mit Hilfe von Prädiktionsprogrammen putative Zielgene ermittelt werden. Von den 365 gemessenen miRNAs wurden so 11 miRNAs unter den genannten Gesichtspunkten als mögliche Variablen der Genregulation identifiziert.

Im **Arbeitspaket 1.4** untersuchten wir den Arzneimitteltransport in humanen Leberzellen. In enger Zusammenarbeit mit unserem KMU-Partner PRIMACYT wurde das *Know-How* der Gewinnung und Kultivierung humaner und tierischer Hepatocyten (Affe, Hund, Ratte) in unserer Gruppe etabliert. Die isolierten Leberzellen wurden unserer Gruppe durch PRIMACYT für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung gestellt.

In einem umfangreichen Forschungsprojekt in Zusammenarbeit mit der Firma PRIMACYT und dem Zentrum für Innovationskompetenz: Funktionelle Genomforschung wurde der Einfluss verschiedener Arzneimittel auf das Transkriptom von Hepatozyten untersucht. Den wissenschaftlichen Hintergrund der Untersuchungen stellen unerwünschte Arzneimittelinteraktionen dar, die häufig durch die Induktion von Arzneimittel-metabolisierenden Enzymen und / oder von Arzneimittel-Transportern im Darm und der Leber durch co-medizierte Arzneistoffe verursacht werden. Die Mechanismen der Induktion und das Verhalten primärer Kandidatengene unter Induktion sind gut erforscht (Aktivierung nukleärer Rezeptoren). Bisher gab es jedoch keine systematischen Untersuchungen zur

transkriptomweiten Regulation von Enzymen und Transporter durch „Problemarzneistoffe“ wie Rifampicin und Johanniskraut, die in der klinischen Praxis sehr häufig zu unerwünschten und schwer vorhersagbaren Wechselwirkungen mit anderen Arzneistoffen führen.

Konkretes Ziel des Projekts war die Identifizierung von Genen, welche durch die Arzneistoffe Rifampicin, Carbamazpin, Efavirenz, Hyperforin und Knoblauchextrakt in der menschlichen Leber induziert werden. Hierzu erfolgte eine transkriptomweite Analyse mittels DNA-Microarrays von drei Hepatozytenkulturen nach Vorbehandlung mit den oben genannten Arzneistoffen. Die Versuche stellten einen komplexen Vorversuch dar, um die hauptsächlich regulierten Gene zu identifizieren und nachfolgend die Expression dieser Gene in einem zweiten Teil der Studie mithilfe von hochempfindlichen TaqMan-*Low Density Arrays* (48 Gene gleichzeitig quantifizierbar) anhand einer statistisch belastbaren Anzahl von Hepatozytenexperimenten (N=6) zu verifizieren. Folgende Gene wurden für die Expressionsanalyse im zweiten Teil der Studie berücksichtigt: **Arzneimitteltransporter** (ABCB1 ABCB4 ABCC1 ABCC2 ABCC3 ABCC4 ABCB11, ABCG2 ABCC5 SLCO1A2, SLCO1B1, SLCO1B3, SLCO2B1, SLCO4A1, SLC10A1,SLC19A2, SLC19A3, SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, SLC22A4, SLC22A5, SLC22A7, SLC47A1, SLC47A2), **metabolisierende Enzyme** (CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, UGT1A1, UGT2B7, UGT2B15, SULT1A2) sowie **nukleäre Rezeptoren** (PXR, CAR, FXR, LXR).

Es zeigte sich, dass insbesondere die Arzneistoffe, für welche zahlreiche klinisch relevante Wechselwirkungen mit anderen Arzneistoffen bekannt sind (Carbamazepin, Efavirenz und Rifampicn) eine starke Induktion von Arzneistoff-metabolisierenden Enzymen der CYP-Familie und klinisch bedeutsamen Transportern wie ABCB1, ABCC2 und ABCG2 verursachten. Diese komplexen Regulationsprozesse sind höchstwahrscheinlich die Ursache für die Entstehung der erwähnten, unerwünschten Medikamenteninteraktionen (Manuskript wird derzeit erstellt).

In einem weiteren Projekt widmeten wir uns der funktionellen Charakterisierung der Transportfunktion von primären menschlichen und tierischen Hepatozyten. Hierbei entwickelten wir ein Standardprotokoll zur schnellen und effizienten Charakterisierung der Zellen. Diese Informationen sind von großer Bedeutung für potentielle Kunden der Firma PRIMACYT, deren Hauptgeschäftsfeld der Vertrieb entsprechender Leberzellen darstellt. Die dabei erhobenen Daten dienten als Grundlage für die erfolgreiche Einwerbung von Landesmitteln im Rahmen eines Verbundprojektes mit der PRIMACYT GmbH (Kryokonservierung humaner Hepatozyten auf Multiwellplatten; FKZ V-630-S-108-2011/039 und V-630-S-108-2011/040).

In diesem Arbeitspaket führten wir zudem die Charakterisierung des Metabolismus und Transports des Schmerzmittels Flupirtin (Katadolon®) durch und klärten das mögliche Interaktionspotential von Sirolimus, Tacrolimus und Efavirenz auf die Phase-II-Metabolisierung des Lipidsenkers Ezetimib ab (Oswald et al., Clin Pharmacol Ther 2010, 87:663 & 2011, 89:524 und 2012, 91:506). Hierbei zeigte sich, dass Tacrolimus und Efavirenz neben der Beeinflussung von Transporterproteinen auch potente Hemmstoffe der UGT1A1-vermittelten Glukuronidierung sind und somit zu klinisch bedeutsamen Interaktionsgeschehen führen können.

Im **Arbeitspaket 1.5** unseres Projekts untersuchten wir die Expression und funktionelle Bedeutung von Transporterproteinen in zellulären Zielkompartimeneten (Thrombozyten, Kardiomyozyten oder auch Makrophagen) und Organbarrieren (Plazenta). Da diese Strukturen bislang kaum im Interesse der pharmakokinetischen Forschung lagen, sind Informationen über die grundsätzliche Expression und Lokalisation arzneimitteltransportierender Proteine nur eingeschränkt verfügbar. Aus diesem Grund war es zunächst notwendig, die Expression dieser Proteine in den jeweiligen Strukturen näher zu charakterisieren.

Mit Blick auf das **Herz** (Kardiomyozyten) führten wir dazu unter Verwendung des im Rahmen dieses Projekts angeschafften *real-time* PCR-Geräts initial Expressionsanalysen mittels

TaqMan *Low Density Array* für kardiale Aufnahme- und Effluxtransporter durch. Dabei konnten wir einerseits die kardiale Expression von Effluxtransportern wie ABCB1, ABCC5 und ABCG2 bestätigen und darüber hinaus signifikante mRNA-Signale der Aufnahmetransporter OCT3, MATE-1, OATP3A1, OATP4A1 und OATP5A1 nachweisen.
Im Hinblick auf die funktionelle Komponente von kardialen Transportern haben wir uns mit der Regulation ausgewählter ABC-Transporter durch das Zytostatikum Doxorubicin beschäftigt. Doxorubicin ist aus kardialer Sicht interessant, da eine häufige und oft dosislimitierende Nebenwirkung die Entwicklung einer Kardiomyopathie ist. Im Detail wurden hier die Expression von Abcb1a/b sowie Abca1 und Abcg1 (beides Cholesteroltransporter) in HL-1 Zellen (eine murine Kardiomyozytenzelllinie) untersucht. Bei Abcb1a/b handelt es sich um den bekanntesten Vertreter der ABC-Transportfamilie, welcher für eine Reihe von Tumorresistenzen verantwortlich gemacht werden kann, indem Chemotherapeutika, unter anderem auch Doxorubicin, aus der Zelle heraus transportiert werden. Abca1 und Abcg1 hingegen sind wichtige Cholesterol-Transporter, welche eine große Bedeutung im Cholesterol-Stoffwechsel/Transport besitzen. Für alle drei Transporter konnten wir deutliche Expressionserhöhungen unter Doxorubicin zeigen. Diese Ergebnisse konnten im Rahmen einer Promotionsarbeit für Abcb1 bereits auf Protein- und Funktionsebene bestätigt werden (Budde et al., J Pharm Sci 2011, 100:3951).

Um die Funktion und Regulationsmechanismen der Cholesterol-Transporter Abca1 und Abcg1 im Herzen aufzuklären, wurden Transkriptionsfaktoren wie LXR und RXR näher betrachtet. Dabei konnte ebenfalls eine Induktion auf mRNA-Ebene beobachtet und nachfolgend auf Proteinebene verifiziert werden. Assoziierte Funktionsassays konnten zeigen, dass der Cholesterolefflux (Cholesterol ist ein Substrat der beiden Effluxpumpen ABCA1 und G1) nach Behandlung der Zellen mit Doxorubicin signifikant erhöht war, was mit den Beobachtungen auf RNA- und Proteinebene übereinstimmt.
Zusätzlich beschäftigen wir uns mit Transporterregulation durch endogene LXR und RXR-Liganden, den so genannten Oxysterolen, die evtl. als zugrunde liegender Mechanismus der beobachteten Induktionseffekte in Betracht kommen. Hier interessierte uns insbesondere, ob Oxysterole verstärkt unter Doxorubicingabe gebildet werden. Um den bereits postulierten Mechanismus der Induktion zu untersuchen, haben wir in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Lütjohann aus der Abteilung für Klinische Chemie und Pharmakologie der Universität Bonn verschiedene Cholesterol-Derivate (Oxysterole), die die endogenen Liganden dieses Rezeptors darstellen, in mit Doxorubicin behandelten HL-1 Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass zwei Oxysterole sowohl im Zellüberstand als auch in den Zelllysaten deutlich erhöht waren. Um diese Ergebnisse weiter zu verifizieren behandelten wir die HL-1 Zellen zusätzlich mit einem LXR-Antagonisten, welcher die beobachtete ABCA1 Induktion verhindern sollte. Erste Ergebnisse zeigen hier tatsächlich eine derartige Beeinflussung der ABCA1 Expression in unserem System.

In **Thrombozyten** konnten wir neben der bereits bekannten Expression von ABCC4 in den dichten Granula dieser Zellen, die Expression des Aufnahmetransporters OATP2B1 mittels Western Blot und Immunfluoreszenz zeigen. Diese Ergebnisse wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Terasaki (Sedai, Japan), die das OATP2B1-Protein mittels einer LC-MS/MS-Methode zur Analyse von Membranproteinen nachweisen konnten, bestätigt. Wir konnten weiterhin zeigen, dass dieser Transporter nicht nur für die Aufnahme seines Standardsubstrates Estron-3-sulfat verantwortlich ist, sondern sehr wahrscheinlich auch die Aufnahme von Statinen in diese Strukturen vermittelt (Niessen et al., Drug Metab Dispos 2009, 37:1129). Mit Blick auf Atorvastatin, einem OATP2B1-Substrat, zeigte sich dies einerseits an einer, durch Estron-3-Sulfat hemmbaren Aufnahme in die Thrombozyten. Anderseits konnten wir in den Thrombozyten die Zielstruktur der Statine, die HMG-CoA Reduktase, nachweisen und zeigen, dass Atorvastatin dieses Enzym in den Thrombozyten hemmt. Dieser Effekt ließ sich durch OATP2B1-Inhibitoren modulieren. Dieser Befund trägt möglicherweise zu den beobachteten pleiotropen Effekten der Statine bei.

Auf diesen Befunden aufbauend untersuchten wir nachfolgend die Expression von ABC-Transportern in Thrombozyten. Hierbei haben wir zunächst unter Verwendung eines TaqMan *Low Density Arrays* die Expression von thrombozytären mRNA-Transkripten bestimmt.

Hierbei konnten wir für eine Reihe dieser ABC-Transporter nachweisen, dass die mRNA-Expression einiger Transportergene die für ABCC4 oder ABCC3 kodieren im Vergleich zu den Vorläuferzellen sogar merklich erhöht war. Darüber hinaus haben wir die Expression einer Reihe dieser Transporter mittels LC-MS/MS hinsichtlich ihrer Proteinexpression untersucht. Auch mit dieser Methode gelang der eindeutige Nachweis einiger ABC-Transporter, darunter auch die bereits auf RNA-Ebene identifizierten ABCC4 und ABCC3. Zur Verifizierung dieser Screeningergebnisse, die ABCC4 Expression war dabei bereits aus vorangehenden Untersuchungen bekannt, wurden im Anschluss Western Blot und Immunfluoreszenzuntersuchungen durchgeführt (Niessen et al., Pharmacogenet Genomics. 2010, 20(6):396.).

Ein weiteres Teilprojektes beschäftigte sich intensiv mit der Charakterisierung der Transporterexpression und -funktion in der humanen **Plazenta**. Neben physiologischen Schranken wie der Blut-Hirn-Barriere oder dem Endothel des Darms ist die Blut-Plazenta-Schranke aus pharmakologischer Sicht von besonderer Bedeutung. Über diese Barriere findet nicht nur der physiologische Stoffaustausch zwischen der Mutter und dem ungeborenen Kind statt, hier entscheidet sich auch, welche Arzneistoffe vom maternalen in den kindlichen Kreislauf übergehen und somit auch im Fetus gewollt oder ungewollt wirksam werden können.

Während die Expression wichtiger Effluxtransporter wie ABCB1, ABCC2 oder ABCG2 in diesem Organ bereits ausgiebig untersucht ist, ist das Verständnis hinsichtlich der Expression und Funktion der verschiedenen Aufnahmetransporter wie Mitgliedern der *organic anion* (OAT) und *organic cation transporter* (OCT/OCTN) sowie der *organic anion transporting polypeptides* (OATP) noch unzureichend. Aus diesem Grund haben wir uns zunächst insbesondere den Carnitintransportern OCTN1 und 2 gewidmet und konnten zeigen, dass die plazentare Expression des OCTN2 mit einem Promotorpolymorphismus innerhalb einer Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor (-207 G zu C, Bindungsstelle für HSF (heat shock factor)) assoziiert ist. Zusätzlich zu den OCTN-Transportern haben wir auch weitere, pharmakologisch interessante Transportproteine, wie die Aufnahmetransporter OATP2B1, OATP4A1 und OAT4 sowie die Effluxtransporter ABCB1, ABCG2 und ABCC1-5 näher analysiert. Während sich für die meisten dieser Transporter keine gestations- oder krankheitsabhängige Veränderung hinsichtlich der mRNA-Expression zeigte, konnte für das ABCG2 eine, allerdings schon aus anderen Arbeiten bekannte, verstärkte Expression in Plazenten von Frühgeburten bestimmt werden. Auffallend war auch die Expression von OATP2B1. Dieser in der basalen Membran des Synzytiotrophoblasten exprimierte Aufnahmetransporter für Steroidkonjugate (insbesondere sulfatierte Verbindungen) zeigte, wie auch der funktionell verwandte OAT4, eine abnehmende Expression mit Zunahme der Schwangerschaftsdauer. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Transportern war hier auch ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression in Plazenten von Mädchen und Jungen festzustellen. Die Expression in Plazenten männlicher Kinder war hierbei um etwa 25% erhöht.

Neben diesen ersten Erkenntnissen war es das eigentliche Ziel dieser Untersuchungen Hinweise auf in ihrer Expression co-regulierte Transporter zu erhalten, die in der Folge dann auf eine funktionelle Interaktion hin untersucht werden sollten. Wir korrelierten daher die Expressionsdaten der jeweiligen Transporter. Dabei zeigte sich interessanterweise, dass nur in sehr wenigen Fällen eine signifikante Korrelation auf Expressionsebene zu beobachten war. Ausnahmen bildeten die drei Aufnahmetransporter OATP2B1, OATP4A1 und OAT4, die in ihrer Expression sowohl mit dem Effluxtransporter ABCG2 als auch miteinander korreliert waren. Allerdings sei als Limitation erwähnt, dass es sich hierbei um mRNA-Expressionsdaten handelt, die sich nicht zwingend auch auf der Proteinebene wiederfinden müssen. Zukünftige Proteinexpressionsanalysen mittels LC-MS/MS sollen hier Klarheit schaffen. Eine elementare Grundvoraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit von ausreichend biologischem Gewebe. Während der Projektlaufzeit konnten wir eine umfangreiche plazentare Gewebebank aufbauen, in der derzeit etwa 500 Plazenten verschiedenster Gestationsalter eingeschlossen sind. In einem ersten experimentellen Ansatz wurde in einem Teil dieser Proben die Expression der Transporterproteine OCTN1 und OCTN2 bestimmt

und mit dem Gestationsalter korreliert, wobei sich allerdings keine signifikanten Unterschiede ergaben. Zudem identifizierten wir die Expression plazentarer microRNAs (miRNA) als mögliche Regulatoren der Transporterexpression. Hierbei sollten einerseits ein miRNA-Profil in Abhängigkeit vom Gestationsalter erstellt und anderseits sollten die dabei auffälligen miRNAs mit den im Gestationsverlauf ebenfalls regulierten Wirkstofftransportern assoziiert werden. Biostatistische Untersuchungen unter Zuhilfenahme von Prädiktionsprogrammen lieferten dabei allerdings nur wenige Hinweise auf eine Interaktion von regulierter miRNA und Transportproteinen. Bei diesen Untersuchungen fiel jedoch eine Assoziation der miRNAs hsa-miR-9 und hsa-miR-429 mit dem *Corticotropin Releasing Hormon* (CRH) auf. Die Weiterführung des beschriebenen Teilprojektes ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt unseres Projektes im Arbeitspaket 1.5 war die Charakterisierung der Bedeutung von Arzneistofftransportern in **pulmonalen Mikrokompartimenten** wie z.B. alveolären Makrophagen zur Entwicklung einer neuen Form des *Drug Targeting* bzw. zur Optimierung bestehender Therapieansätze.

Vor unseren Untersuchungen war hinreichend bekannt, dass sich viele Arzneimittel gut in die menschliche Lunge verteilen, auch in deren Mikrokompartimente, wie in die *epithelial lining fluid* (ELF) oder in Zellen, die durch bronchoalveolare Lavage gewonnen werden können (*broncho-alveolar lavage cells*, BALC). Dabei handelt es sich vorwiegend um Makrophagen. Einige Arzneistoffe erreichen in der ELF und in BALC sogar ein Vielfaches der Serumkonzentration, darunter Antibiotika aus der Gruppe der Makrolide, Tuberkulosemittel wie Clarithromycin, Rifampicin und Isoniazid, oder Mittel, die bei Asthma bronchiale oder COPD (Betablocker und Roflumilast) klinisch eingesetzt werden (Murdoch et al., Semin Respir Infect. 1991;6:112, Conte et al., Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:334). Mit solchen Antiinfektiva kann man auch intrazelluläre Keime erreichen, die in Makrophagen persistieren, sich der körpereigenen Immunabwehr entziehen und für Arzneistoffe schwer zugängig sind (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, Mycobakterien der Actinomycetales-Gruppe); bei Nutztieren sind es besonders Vertreter der Gruppe *Rhodococcus* (z.B. *Rh. equi*), die ernsthaft den Erfolg der Tierzucht durch schwere abszedierende pulmonale Infektionen gefährden (Prescott, Clin Microbiol Rev. 1991;4(1):20). Völlig unbekannt ist allerdings, durch welche Transporter sich Arzneistoffe in die Lunge verteilen, durch welche Faktoren ihre Funktion beeinflusst werden kann und ob sie gezielt im Interesse besserer Arzneistoffwirkung beeinflussbar sind (*boostering*). Es gab vor unseren Untersuchungen Hinweise, dass einige ubiquitär vorkommende Transporter (z.B. ABCB1, ABCC2, ABCG2, OCTN1) auch im Lungengewebe exprimiert werden (van der Deen et a., Respir Res. 2005;6:59, Bosquillon et al. J Pharm Sci. 2010;99(5):2240). Allerdings sind in der Regel weder ihre genaue zelluläre Lokalisation (Bronchial-, Alveolarzelle, BALC), ihre zelluläre Orientierung (basal, apikal) oder ihre Transportrichtung (Aufnahme, Efflux), noch enzymkinetische Transportcharakteristika untersucht worden.

Im Rahmen von InnoProfile haben wir die Expression pulmonaler Transporter in bronchoepithelialen Zellen und Makrophagen (nach FACS-sorting der BALC) mittels bronchoalveolarer Lavage und TaqMan *low density arrays* in acht gesunden Probanden auf mRNA-Ebene durchgeführt. Tabelle 4 gibt einen Überblick der detektierten Transporter.

Tabelle 4: Mittlerer relativer mRNA-Gehalt (Ct-Werte) ausgewählter Transporter in Mikrokompartimenten der menschlichen Lunge, Monozyten und Nasenschleimhaut. Hohe Expression ist dunkelgrün unterlegt, gefolgt von hellgrün, orange und ocker (geringste Expression).

	Monozyten	Alveolarmakrophagen	Bronchialepithel	Nasenepithel
18s	13.23	13.56	15.72	14.73
OATP2B1	30.88	16.53	24.46	24.14
PHT2	19.65	17.55	23.13	23.30
MATE1	27.87	19.66	26.01	26.57
MRP3	23.20	19.85	23.44	24.41
PHT1	21.50	20.46	23.47	23.18
OATP3A1	20.80	20.87	24.52	23.68
BCRP	33.02	21.13	26.92	23.84
MRP1	22.53	21.61	22.60	23.55
OCTN2	24.85	22.90	23.45	24.25
MRP4	24.96	23.97	23.04	24.22
MRP5	24.85	24.26	21.82	25.10
OCTN1	24.40	24.43	20.27	23.99
PEPT2	24.84	25.36	20.82	22.61
OATP4C1	24.12	25.64	23.01	23.51
OCT1	28.71	26.19	27.57	28.90
OCT3	27.14	27.13	27.07	22.82
CT2 / OCT6	26.00	27.48	25.68	29.12
OATP1A2	28.76	27.96	28.46	26.17
MRP2	27.71	29.96	28.82	29.39
OATP4A1	29.01	30.95	29.40	25.70
Pgp	28.94	31.01	26.59	22.94
MRP6	24.46	31.31	22.52	27.07
hPGT	31.82	31.72	24.27	22.36
OATP1B3	32.35	31.85	28.12	27.60
OATP1B1	32.58	32.57	31.28	32.33
CFTR	40.00	35.22	23.33	25.20
MATE2	39.47	35.41	28.21	29.25
OCT2	40.00	38.81	40.00	31.42
OAT4	40.00	40.00	40.00	30.95

Es konnten in dieser Studie neben den bereits beschriebenen Effluxtransportern auch eine Reihe von Aufnahmetransportern identifiziert werden, deren Expression in den Atemwegen zum Teil noch nicht beschrieben wurde. Diese Erkenntnisse dienen als Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Lokalisation der Proteine in den gewonnenen Proben.

Parallel dazu haben wir funktionelle Untersuchungen in Zusammenarbeit mit unserem regionalen Partner Paul-Schockemöhle Pferdehaltung in Neustadt-Glewe durchgeführt. Wir haben uns hierbei aus mehreren Gründen für das tierexperimentelle Modell des Pferdes für pharmakokinetische Untersuchungen zur Funktion pulmonaler Transporter entschieden. Fohlen stehen in Bezug auf die Proteinhomologie und transkriptionale Regulation von *multidrug*-Transportern dem Menschen näher als Nager und sind aufgrund ihrer Körpergröße für Untersuchungen zur Verteilung in pulmonale Mikrokompartimente mittels bronchoalveolarer Lavage hervorragend geeignet (Tyden et al., Toxicol Appl Pharmacol. 2004;201:112 und J Vet Pharmacol Ther.2009;32:167). Außerdem sind Fohlen extrem prädestiniert für abszedierende Lungenerkrankungen durch *Rh. equi*, die man mit Medikamenten erfolgreich behandeln kann, welche aus unserer Sicht gute Demonstrator-Arzneimittel für *Efflux*- und *Uptake*-Transporter sind (z.B. Clarithromycin und Rifampicin). An diesem Modell konnten in InnoProfile folgende wesentliche Erkenntnisse zur Bedeutung pulmonaler Transporter gewonnen werden (Venner et al., Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2010;381:161, Oswald et al., J Pharm Biomed Anal. 2011;55:194, Peters et al., Drug Metab Dispos. 2011;39:1643 and 2012;40:522):

- in bronchoepithelialen Zellen und BALC von Fohlen werden Effluxtransporter wie ABCB1 und ABCC2 sowie ubiquitäre Aufnahme-Transporter wie OATP1A2 und OATP2B1 exprimiert
- die Makrolidantibiotika Tulathromycin und Clarithromycin akkumulieren um ein Vielfaches der Serumkonzentrationen in der ELF und in BALC
- der PXR-Induktor Rifampicin induziert ABCB1 und ABCC2 weder in epithelialen Zellen noch in BALC, obwohl er ausreichend hohe Konzentrationen in der ELF erreicht; die mRNA-Expression von ABCB1 und ABCC2 wird durch Rifampicin eher *down*reguliert
- trotz dieser Effekte von Rifampicin auf ABCB1 und ABCC2 reichert sich Clarithromycin dennoch im Verhältnis zur Serumkonzentration vermehrt in der ELF der Fohlen an
- Wechselwirkungen mit Aufnahme-Transportern der OATP-Familie wurden als Ursache für die pulmonale Anreicherung von Clarithromycin ausgeschlossen, da das Makrolid zwar Inhibitor, selbst aber kein Substrat für OATP1A2 und OATP2B1 ist

Aus dem Spektrum der pharmakokinetischen Daten lässt sich schlussfolgern, dass möglicherweise ABCC1 und ABCC3 basolaterale Effluxtransporter für Clarithromycin im Darm und in Mikrokompartimenten der Lunge sein könnten. Mit Hilfe unserer validierten *In vitro*-Zellmodelle sowie durch tierexperimentelle Untersuchungen an Fohlen werden die Situation beim Menschen prädiktiver und die geplanten *Proof-of-Concept*-Studien an gesunden Probanden besser planbar.

Dieses Wissen soll genutzt werden, um die bestehenden Protokolle zur Therapie der erwähnten Atemwegsinfektion von Pferden unseres KMU-Partners zu optimieren und ist zudem von großem Interesse, um die komplexen Verteilungsvorgänge von Arzneistoffen in das Lungengewebe beschreiben und ggf. vorhersagen zu können. Dieses Verständnis ist auch für unseren regionalen Partner Riemser Arzneimittel AG von großer Bedeutung, da er zahlreiche Arzneimittel vertreibt, deren Wirkort das pulmonale Gewebe darstellt (z.B. Tuberkulosemittel).

Zusammenfassend betrachten wir durch die umfangreiche Charakterisierung der Expression und Funktion von Transportproteinen in Blutzellen (Thrombozyten, Makrophagen), der Plazenta, Herzmuskelzellen und Epithelien (Bronchialepithel, Enterozyten) unseren letzten Projektmeilenstein („Transporter in Mikrokompartimenten“) als vollständig umgesetzt.

Im Forschungsmodul „***Drug Delivery*-Systeme**“ war es unser Ziel, neuartige Arzneiformen für bekannte und neue Arzneistoffe zu entwickeln, deren Absorption durch intestinale Transporter limitiert ist. Für derartige *Drug Delivery*-Systeme sollten zudem neue *In vitro*-Testverfahren zur Vorhersage des *In vivo*-Freisetzungsverhaltens entwickelt werden.

Im entsprechenden **Arbeitpaket 2.1** war es unser Ziel eine Physiologie-basierte Freisetzungsapparatur für orale Arzneiformen zu entwickeln und funktionell zu validieren. Durch bestehende Vorarbeiten gelang es uns zeitnah einen ersten Prototyp eines neuen *In vitro*-Dissolutionsmessplatz zur Simulation der physiologischen Freisetzungsbedingungen im Magen-Darm-Trakt des Menschen zu entwickeln (Abb.2), welches den ersten gesetzten Projektmeilenstein darstellte und zum Patent angemeldet wurde (DE 102008044342 B3, WO 2010063798 A1). Mit diesem Modell lassen sich physiologische Einflüsse wie Peristaltikdruck und Verweilen in Wassernestern des Darmes *in vitro* simulieren und unregelmäßige Absorption unter *In vivo*-Bedingungen beim Menschen vorhersagen. Die funktionelle Eignung des entwickelten Messsystems wurde an zahlreichen marktgängigen Arzneimitteln belegt (z.B. Garbacz et al., Eur J Pharm Biopharm. 2008;70:421 and Eur J Pharm Sci 2009;38:147; Garbacz and Weitschies**,** Drug Dev Ind Pharm. 2010;36:518, Garbacz and Klein, J Pharm Pharmacol. 2012; 64:944). Dieser Messplatz stand der InnoProfile-Gruppe für die Charakterisierung neuer entwickelter *Drug Delivery*-Systeme während der gesamten Projektlaufzeit zur Verfügung.

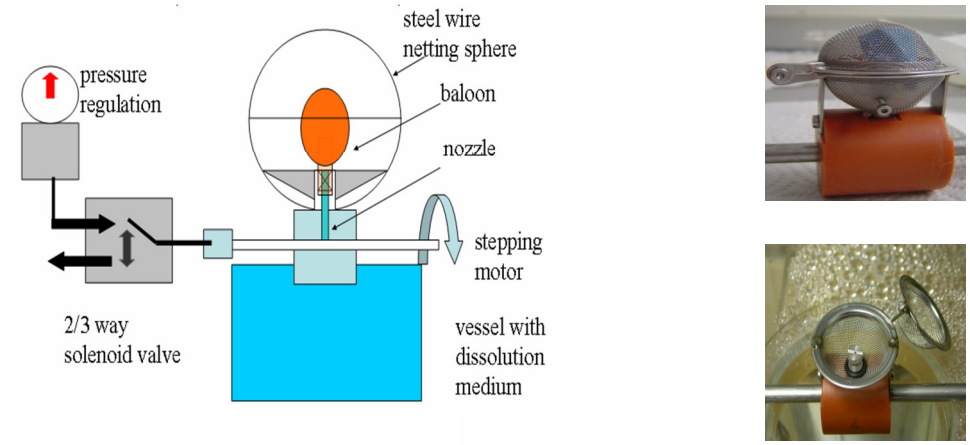


Abb. 2: Schematische Darstellung des physiologischen *In vitro*-Liberationssystems (Stresstester) für orale Arzneiformen mit kontrollierter Freisetzung.

Aufgrund des großen Interesses seitens der pharmazeutischen Industrie an der von unserer Gruppe entwickelten Freisetzungsapparatur für orale Arzneiformen ist es gelungen, am 26.11.2009 das Spin-Off Unternehmen „Physiolution GmbH“ zu gründen. Die Physiolution GmbH bietet neben der Entwicklung und Evaluierung von Freisetzungstestgeräten für spezielle Anwendungen unter anderem auch die präklinische Untersuchung des Freisetzungsverhaltens von festen oralen Darreichungsformen unter biorelevanten Testbedingungen an.

Im **Arbeitspaket 2.2** sollten gastroretentive *Drug Delivery*-Systeme entwickelt werden. Hierbei wurde eine neue Formulierung für den (Modell-) Arzneistoff Furosemid entwickelt. Dieser Arzneistoff hat den therapeutischen Nachteil einer sehr kurzen Halbwertszeit, so dass für eine chronische Therapie z.B. der Hypertonie eine retardierte Arzneiform eingesetzt werden müsste. Konventionelle Ansätze scheitern jedoch, weil Furosemid bevorzugt in den oberen Dünndarmabschnitten resorbiert wird. Ziel der geplanten Arbeiten ist durch die Verlängerung der Aufenthaltszeit der Arzneiform innerhalb des Magens eine kontinuierliche Freisetzung des Wirkstoffes zu erreichen, der somit langsam seinen Resorptionsort erreicht. Die Verlängerung der Magenpassage erfolgt durch starke Volumenzunahme aufgrund von Quellung im Magen. Der gebildete Tablettenkörper soll durch eine flexible Schutzmembran vor Erosionsprozessen geschützt werden, die ansonsten durch die motorische Aktivität des Magens zu einem Versagen der Arzneiform führen kann.

Während der Projektlaufzeit wurden verschiedene Matrixformulierungen getestet und optimiert, die ein starkes und nahezu pH-unabhängiges Quellvermögen aufweisen. Als Schutzüberzug wurde ein Polyvinylacetatfilm gewählt, dessen Wirkstofffreigabecharakteristik durch Zusatz von verschiedenen Weichmachern und Porenbildnern moduliert wurde. Hierdurch ist es uns gelungen, einen Film mit günstigem Freisetzungsverhalten und akzeptablen mechanischen Eigenschaften zu finden. Die Funktionsfähigkeit des Prinzips wurde mit dem neu entwickelten Dissolutions-Messplatz gezeigt. Allerdings war die Wirkstofffreisetzung entgegen den Erwartungen aus Vorexperimenten merklich pH-abhängig, was zu einer intra- und interindividuellen Variabilität der Arzneistofffreisetzung im Magen führen könnte. Das Freisetzungsprinzip wurde mit einem zweiten Arzneistoff (Paracetamol) mit anderen physikochemischen Eigenschaften verifiziert. Hier ergab sich die gleiche Freisetzungs- Charakteristik bei insgesamt höherer Freisetzungsgeschwindigkeit.

Daneben wurde ein zweiter Formulierungsansatz entwickelt, der auf einen äußeren Schutzüberzug verzichtet. Diese Matrixformulierung basierend auf Kollicoat SR 30D in Zusammenwirkung mit Agar als Gelbildner erzielte ebenfalls einen mechanisch unempfindlichen und stark quellenden Tablettenkörper, der die Wirkstofffreisetzung über mehr als 12 Stunden verzögerte und somit eine merkliche Retardierung der

Arzneistoffwirkung *in vivo* vermuten lässt. Auch diese Prinzip wurde mit einem zweiten Arzneistoff und unter Verwendung des physiologischen *In vitro*-Freisetzungstestgerätes verifiziert.

Arbeitspaket 2.3. zielte auf die Entwicklung von pulsatilen Freisetzungssystemen ab. Hierbei untersuchten wir initial die Möglichkeit, kontrollierte Gasproduktion in der Arzneiform als treibende Kraft der Arzneistofffreisetzung zu nutzen. Erste erfolgreiche Formulierungen nutzen Hefezellen als Bestandteil von Tabletten, die nach kurzem Kontakt mit wenig Flüssigkeit in einem gesteuerten Prozess Kohlendioxid produzieren. Das dabei frei werdende Gas soll entweder einen Überzug zu einem vorbestimmten Zeitpunkt platzen lassen, so dass der Wirkstoff pulsativ freigesetzt wird, oder definierte Poren im Überzug erzeugen, durch die der Arzneistoff über einen Zeitraum von mehreren Stunden mit konstanter Geschwindigkeit freigesetzt wird. Das Prinzip bietet gegenüber konventionellen Tablettenformulierungen unter anderem den Vorteil, dass dieser Prozess nach kurzem Kontakt mit wenig Flüssigkeit stetig ablaufen kann. Aufgrund der Neuheit des Prinzip wurde ein gemeinsamer Patentantrag mit unserem KMU-Partner LTS gestellt und genehmigt (DE 102007041588 A1; WO2009052888 A2).

Die Formulierung der erwähnten Überzüge gestaltete sich anfangs problematisch, was sich in mangelnder Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ausdrückte. Für das teilweise Versagen der Überzüge wurden Inhomogenitäten der Filmüberzüge sowie schwankende Porositäten identifiziert. Die Probleme konnten gelöst werden, indem die genaue Charakterisierung der Tablettenoberflächen mittels des aus Projektgeldern angeschafften Rasterelektronen-Mikroskops (REM) routinemäßig durchgeführt wurde, die Herstellungstechnologie auf ein Wirbelschichtverfahren umgestellt wurde und die verwendeten Membranmaterialien optimiert wurden.

Eine weitere von unserer Gruppe entwickelte Strategie zur gesteuerten Freisetzung von Arzneistoffen stellt die Nutzung von Flüssiggasen da. Diese toxikologisch unbedenklichen Verbindungen liegen bei Raumtemperatur im flüssigen Aggregatzustand vor, sieden jedoch bei Körpertemperatur und führen somit zur Gasentwicklung in der Arzneiform nach oraler Einnahme. Somit lassen sich Arzneistoffzubereitungen sowohl initial als auch kontinuierlich über einen längeren Zeitraum aus der Arzneiform freisetzen. Für dieses Prinzip wurde ebenfalls ein Patent angemeldet (DE 102009027938 A1).

Ein konkretes pulsatiles *Drug Delivery*-System wurde für das Analgetikum Metamizol entwickelt. Seine analgetische Wirkung kann mit der von Opioid-Analgetika wie Tramadol verglichen werden. Demzufolge ist Metamizol besonders in der Tumorschmerztherapie ein unverzichtbares Analgetikum. Bei der praktischen Anwendung dieses Arzneistoffes treten jedoch eine Reihe von Unzulänglichkeiten auf, welche vor allem aus einer relativ kurzen Halbwertszeit von 3 h und einer verhältnismäßig hohen Dosierung im Rahmen der Tumorschmerzbehandlung (max. Tagesdosen: 5-6 g) resultieren. Die durch die kurze Halbwertszeit bedingte erhöhte Einnahmefrequenz führt vor allem in der nächtlichen Anwendung zu Problemen, da ein schmerzfreies Durchschlafen praktisch nicht möglich ist. Daneben ist das Schlucken sehr großer Tabletten für viele Patienten oft schwierig. Aus diesem Grund sollte eine orale Arzneiform für Metamizol mit einem gepulsten Freisetzungsprofil entwickelt werden. Angestrebt wurde eine monolithische Arzneiform mit einer *lag time* (Zeit ohne relevante Arzneistofffreisetzung) von ca. 4 h und anschließender schlagartiger Wirkstofffreisetzung innerhalb von 1-2 h. Dadurch sollte es ermöglicht werden, die Tablette abends vor dem Einschlafen einzunehmen, um dann nach ca. 5-6 h eine maximale Wirkung zu erzielen. Die pulsatile Freisetzung sollte hierbei durch die Kombination eines möglichst wasserdichten Überzuges mit einem wasserlöslichen Porenbildner erzielt werden.

Innerhalb des Projektes wurden zunächst grundlegende analytische Fragestellungen zum Wirkstoff (Nachweismethode, Stabilitätsfragen) sowie verschiedene Kernrezepturen mit unterschiedlichen Sprengmitteln hinsichtlich ihres Quellverhaltens bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Dabei erwiesen sich Wirbelschichtgranulate mit PVP als Granulierhilfsstoff als ungeeignet, bessere Resultate wurden mit einem Krustengranulat

erzielt. Die Kerne wurden mit verschiedenen Polymeren (Ethylcellulose, Celluloseacetat) in unterschiedlichen Rezepturen überzogen. Ethylcelluloseüberzüge, insbesondere Chargen mit geringer Viskositat, erwiesen sich als deutlich spröder gegenüber Celluloseacetatüberzügen. Eine schlagartige Freisetzung nach steuerbaren *lag*-Zeiten von 1 bis 3 Stunden konnte mit Überzügen variabler Schichtdicke erzielt werden. Diese enthielten Ethylcellulose als Grundpolymer, Dibutylphthalat als Weichmacher und Hydroxypropylmethylecellulose als Porenbildner. Die Porenbildung konnte durch rasterkraftmikroskopische Aufnahmen verifiziert werden. Die *lag*-Zeiten erwiesen sich allerdings als extrem sensitiv bezüglich der Überzugsmenge. Dies führte initial zu schwer reproduzierbaren Ergebnissen, konnte nach Optimierung der Rezeptur aber gelöst werden.

Die Entwicklung von mukoadhäsiven Arzneiformen Stand im Zentrum von **Arbeitspaket 2.4**. Aufgrund der intensiven Bearbeitung der anderen Arbeitspakete im Modul 2 konnte hier nur relativ wenig Forschungszeit investiert werden. Hierbei stand zunächst die Entwicklung von Zubereitungen zur Behandlung von Menstruationsschmerzen im Vordergrund. Hierbei sollte ein arzneistoffhaltiger Tampon entwickelt werden. Das zugrunde liegende Prinzip lässt sich aber auch auf andere Bereiche wie den Gastrointestinaltrakt übertragen. Die Arzneiform soll hierbei jeweils aus einem dünnen, wirkstoffhaltigen Film bestehen, welcher in gefalteter Form auf einen Tampon aufgebracht wird. Durch die Ausdehnung des Tampons in Gegenwart von Flüssigkeit soll der Film schnellstmöglich in Kontakt mit der vaginalen Schleimhaut gelangen und hier den Wirkstoff möglichst unmittelbar zur Resorption bringen. Im Berichtzeitraum wurde begonnen verschiedene Polymerrezepturen hinsichtlich ihrer filmbildenden Eigenschaften zu testen. Es wurden Hydroxypropylmethylcellulosen (HPMC) unterschiedlicher Viskosität untersucht. Dabei zeigte sich vor allem eine HPMC mit einer Viskosität von 100 mPas (2%ige Lösung) als vielversprechend. Darüber hinaus wurde ein geeigneter sogenannter *backinglayer* für das Ausziehen der Filme identifiziert. Erste Ansätze mit Polymerkonzentrationen zwischen 5 und 10%, einem Weichmacheranteil von 10% und Diclofenac-Na-Konzentrationen von 5-10 mg/ml erscheinen für weiterführende Untersuchungen vielversprechend. Die Arbeiten werden derzeit in einer Doktorarbeit weitergeführt.

Im **Arbeitspaket 2.5** (Arzneiformen für Kolon-*Targeting*, Peptide und Proteine) wurde ein neuer Ansatz entwickelt. Ziel ist hierbei, dass die Arzneiform die Magen-Darm-Passage bis zum Erreichen des tiefen Dünndarms unverändert übersteht und den Arzneistoff dann möglichst rasch freigibt. Der Ansatz besteht aus einer Arzneiform, die einen magensaftresistenten Überzug aufweist, der sich im Dünndarm möglichst zeitnah löst. Während der Gastrointestinalpassage soll die Arzneiform Flüssigkeit durch Quellung aufnehmen. Ein Schutzüberzug soll vorzeitige Erosion verhindern. Die schlagartige Wirkstofffreisetzung soll dann durch mechanischen Druck bei Passage der Ileocäcalklappe (Übergang des Dünndarms in den Dickdarm) und ein damit verbundenes Platzen des Schutzüberzuges erreicht werden.

In der Projektlaufzeit wurden hierbei verschieden Kernrezepturen getestet und hinsichtlich ihres Wasserbindungsvermögens optimiert. Das gebundene Wasser soll sicherstellen, dass im Dickdarm bereits eine Wirkstofflösung freigesetzt wird und kein zusätzliches Resorptionshindernis vorhanden ist. Als optimaler Hilfsstoff wurde hier Hydroxypropylmethylcellulose identifiziert. Die Kerne wurden mit verschiedenen Polymeren (Polyvinylacetat, Polyacrylat, Ethylcellulose, Celluloseacetat) überzogen. Filme aus Eudragit® RS erwiesen sich als quellfähig und wasserpermeabel, ohne im Beobachtungszeitfenster von 8 Stunden eine merkliche Freisetzung des Modellarzneistoffs Paracetamol durch Diffusion zu erlauben. Diese wurde erst durch Ausübung von mechanischem Druck auf die Arzneiform ermöglicht. Die Ruptur der Filme wurde mittels Texture-Analyser nachgewiesen, allerdings sind die dafür nötigen Drücke bei den getesteten Arzneiformen noch oberhalb der bei der Passage der Ileocaecalklappe physiologisch auftretenden Drücke. Das Überstehen der ersten physiologischen Druckbelastung bei der Pyloruspassage wurde durch ein magensaftresistentes *Top-Coating* mit Eudragit® L sichergestellt.

Weiterführend wurden mehrere Arzneiformen entwickelt, die den Wirkstoff auf unterschiedlichen Prinzipien basierend nach Druckeinwirkung freigeben sollten. In einem ersten Ansatz wurden Agarkugeln (Hydrogel) unterschiedlicher Zusammensetzung getestet. Diese zeigten bei Bruchfestigkeitsversuchen zunächst gute Ergebnisse, das heißt einen eindeutigen Bruch der untersuchten Arzneiform. Beim anschließenden Freisetzungsversuch in der Stresstestapparatur (Arbeitspaket 2.1), bei der die Arzneiform nicht nur dem Druck, sondern auch dem Einfluss von Freisetzungsmedien und Bewegung ausgesetzt ist, stellte sich allerdings heraus, dass es sich bei der Arzneistofffreisetzung eher um Diffusionsprozesse aufgrund der hydrophilen Matrix handelt, als um eine druckgesteuerte Wirkstofffreisetzung.

Das zweite untersuchte Prinzip basiert auf einer Hartfettkugel mit suspendiertem Wirkstoff, welche im Trommel-Coater mit Celluloseacetat überzogen wurde. Das Hartfett schmilzt bei Körpertemperatur, wird jedoch durch den Überzug ballonartig zusammengehalten. Unter der Einwirkung von Druck kann auch diese Arzneiform zum Platzen gebracht werden. Durch das Aufbringen verschiedener Polymerbeladungen konnte der erforderliche Druck, der zum Platzen der Arzneiform nötig ist, eingestellt werden. Bei Freisetzungsversuchen in der Stresstestapparatur konnte gezeigt werden, dass in der 30-minütigen Inkubationsphase im Medium durch den Überzug kein Wirkstoff freigesetzt wurde, während bei der Einwirkung des entsprechenden Drucks, der auch während der Gastrointestinalpassage auftritt, die Arzneiform zerplatzte und sofort 80-100% des inkorporierten Wirkstoffs freisetzte. Dies ist ein vielversprechendes Prinzip, welches sowohl für gelöste lipophile als auch suspendierte hydrophile Wirkstoffe zum Einsatz kommen könnte.

Der dritte Ansatz besteht aus einer Tristearinkapsel, die durch Innenbeschichtung einer Hartgelatinekapsel, anschließendes Befüllen mit einem Hydrogel und Verschließen mit einem Tristearindeckel hergestellt wurde. Durch die Variation des zur Innenbeschichtung verwendeten Volumens konnte die Schichtdicke und damit auch die Stabilität der Kapsel beeinflusst werden. Auch bei dieser Arzneiform zeigten erste Untersuchungen im Stresstester, dass während der normalen Inkubation in magensaftsimulierendem Medium kein Wirkstoff freigesetzt wird. Bei der Einwirkung von 300 mbar (welches dem Druck auf die Arzneiform während der Pyloruspassage entspricht) wurde die Arzneiform zerstört und setzte den Inhalt, sofern vollständig zerplatzt, unmittelbar und bis zu 100% frei.

Die Ergebnisse sind bisher äußerst viel versprechend. Neben einer druckaktivierten Freisetzung sollen in Folgeprojekten auch enzymkontrollierte Freisetzungsmechanismen getestet werden, die die Stoffwechselaktivität der physiologischen Dickdarmflora ausnutzen. Elementare Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis der bakteriellen Darmflora des Menschen. In diesem Zusammenhang wurde ein 3-monatiger Forschungsauslandsaufenthalt von Herrn Dr. Glöckl bei TNO in den Niederlanden durchgeführt und das entsprechende *Know-How* in der Gruppe etabliert.

Bei TNO ist mit dem TIM-2-System die Kultivierung eines natürlichen Dickdarmmilieus seit Jahren etabliert. Während des 3-monatigen Aufenthalts wurde das Arbeiten unter anaeroben Bedingungen sowie das Betreiben des TIM-2-Systems erlernt. In das System wurde erstmalig ein Redox-Messsystem integriert, welches die kontinuierliche Überwachung des Redox-Status im System ermöglicht. Die Arbeiten zeigten, dass sich nach einer Adaptationsperiode von 12-16 Stunden ein stark reduktives Milieu ausprägt, welches über etwa 48 Stunden konstant bleibt. Im System wurden Studien zur Metabolisierung und Elimination von im Kolon enzymatisch aktivierten Arzneistoffen durchgeführt (Olsalazin, Natriumpicosulfat). Zusätzlich wurde die Wirkung ausgewählter Laxantien und Antibiotika auf die Bakterienflora untersucht. Aufgrund von bei TNO nicht etablierten Methoden sind bisher nicht alle Experimente abschließend ausgewertet. Allerdings sind die während des Aufenthalts erlernten Fähigkeiten für die Konzeption eines eigenen Testsystems zur Simulation des Kolonmilieus unverzichtbar. Das gewonnene Wissen soll zukünftig in Greifswald zur Etablierung einer Dickdarmkultur führen, die mittelfristig die Untersuchung von Arzneiformen mit beabsichtigter Freisetzung im Kolon (*colon targeting*) ermöglicht.

Zusammenfassend gestaltete sich unser Projekt auf wissenschaftlich-technischer Ebene sehr erfolgreich und entspricht in Bezug auf die Module „Transportermodelle“ und „*Drug Delivery*-Technologien“ in allen wesentlichen Aspekten dem vorgesehenen Arbeitsplan. Während der Projektlaufzeit sind 36 Manuskripte zur Publikationen in hochrangigen internationalen Zeitschriften akzeptiert worden, es wurden Forschungsergebnisse in 71 Abstracts auf nationalen und internationalen Tagungen vorgestellt und es sind im Rahmen des Projektes 53 wissenschaftliche Arbeiten (Promotion, Diplom) entstanden (siehe Punkt 2.5). Drei entwickelte Technologieprinzipien wurden patentiert und es erfolgte die Ausgründung einer Firma. Ein unbestreitbarer Höhepunkt unseres InnoProfile-Projektes stellte die Genehmigung eines Institutsneubaus für die Pharmakologie und die Pharmazeutische Technologie durch den Wissenschaftsrat als ein Vorhaben von nationaler Bedeutung dar. Dieser Antrag wurde insbesondere mit dem Verweis auf unser erfolgreiches, interdisziplinäres Verbundprojekt formuliert. Der C_DAT-Neubau schaffte der InnoProfile-Gruppe eine gemeinsame räumliche Struktur und optimierte die Zusammenarbeit der beteiligten Abteilungen signifikant.

2.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wesentlichsten Aufwendungen zur Realisierung des Projektes ergaben sich durch das angestellte Fachpersonal in der Forschungsgruppe, durch durchgeführte Dienstreisen, Auslandsaufenthalte und Weiterbildungsvorträge sowie der Anschaffung von Forschungsgeräten. Alle genannten Positionen werden nachfolgend kurz besprochen.

Alle Personalstellen waren durchgängig mit fachlich sehr gut geeigneten und motivierten Mitarbeitern besetzt, die intensiv an den Einzelvorhaben arbeiteten (fünf Postdocs, vier Doktoranden, vier studentische Hilfskräfte). Die Vergütung aller Mitarbeiter erfolgte nach gültigen Tarifverträgen des öffentlichen Dienstes (TV-L) und ergab sich demgemäß aus der Zugehörigkeitsdauer der Mitarbeiter. Alle postdoktoralen Mitarbeiter des Projektes hatten eine große fachliche Expertise, ohne die das Projekt nicht realisierbar gewesen wäre.

Zur Präsentation unserer Forschungsergebnisse vor Fachkollegen aus Hochschule und Industrie nahmen Mitarbeiter des Projektes an zahlreichen nationalen und internationalen Fachtagungen, Symposien oder Workshops teil. Diese Reisen stellten für unser Projekt eine exzellente Plattform zur Vorstellung und Diskussion unserer Forschungsergebnisse mit Fachkollegen dar. Zudem konnten nachhaltige nationale und internationale Kontakte geknüpft werden, die zu mehrmonatigen Auslandsaufenthalten von Mitarbeitern führten und Forschungskooperationen initiierten (z.B. Tabelle 3). Zudem stellten die getätigten Reisen, die wir zum Teil gemeinsam mit Kollegen unserer KMU-Partner durchführten, eine sehr gute Weiterbildungsoption dar. Nachfolgende Tabelle 5 fasst die durchgeführten Dienstreisen zusammen.

Tabelle 5: Übersicht der im Rahmen des InnoProfile-Projektes getätigten Inlands- und Auslandsdienstreisen

Datum	Tagungsort	Tagung
2007	Sendai, Japan	8th *International ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) Meeting*
	Long Beach, USA	CRS (*Controlled Release Society*) Annual Meeting 2007
	Kiel	9. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie
2008	Wien, Österreich	10th European ISSX (*International Society for the Study of Xenobiotics*) Meeting
	New York, USA	CRS (*Controlled Release Society*) Annual Meeting 2008
	Orlando, USA	ASCPT (*American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics*) Annual Meeting 2008
	Innsbruck, Österreich	2nd FEBS *Special Meeting „ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases*“
	Bonn	DPhG (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft) Jahrestagung
	Berlin	10. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie
2009	Lissabon, Portugal	11th *European ISSX (International Society for the Study of*

		Xenobiotics) Meeting
	Kopenhagen, Dänemark	CRS (*Controlled Release Society*) Annual Meeting 2009
	Washington, USA	ASCPT (*American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics*) *Annual Meeting 2009*
	Berlin	Proteomic Forum 2009
	Thun, Schweiz	*BioMedical Transporters 2009: "Membrane Transporters and their impact on drug discovery"*
	Jena	DPhG (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft) Jahrestagung
	Berlin	*Epigenetics World Congress*
	Saarbrücken	MEMTRANS Workshop
2010	Malta	7th *World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*
	Atlanta, USA	ASCPT (*American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics*) *Annual Meeting 2010*
	Istanbul, Türkei	9th *International ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) Meeting*
	Kopenhagen, Dänemark	WorldPharma-Kongress
	Braunschweig	DPhG (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft) Jahrestagung
	Würzburg	12. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie
2011	Washington, USA	AAPS (*American Association of Pharmaceutical Scientists*) *Annual Meeting 2011*
	Dallas, USA	ASCPT (*American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics*) *Annual Meeting 2011*
	Grindelwald, Schweiz	BioMedical *Transporters 2011: "Membrane Transporters in Drug Discovery"*
	Berlin	Proteomic Forum 2011
	Heringsdorf	DPhG-Doktorandentagung
	Bad Herrenalb	13. Treffen der Blut-Hirnschanke-Experten
	München	*RNAi & miRNA Europe Conference*
	Zürich, Schweiz	13. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie
2012	Washington, USA	ASCPT (*American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics*) *Annual Meeting* 2012
	Istanbul, Türkei	8th *World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*
	Dresden	DGPT (Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie) Jahrestagung
	Innsbruck, Österreich	4th FEBS Special Meeting: *ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases*

Zusätzlich wurden die nachfolgenden drei Auslandsaufenthalte von Gruppenmitgliedern zu folgenden Inhalten realisiert:

- **Forschungsaufenthalt bei TNO, Zeist, Niederlande vom 2.5.-28.7.2011:** Die Arbeitsgruppe „Pharmacokinetics & Human Studies" bei TNO entwickelt seit mehr als 10 Jahren Testsysteme, die die physiologischen Bedingungen im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier simulieren. Kern der Systeme, die das terminale Ileum und das Colon ascendens imitieren, ist die unter anaeroben Bedingungen stabil kultivierte Mikroflora. Mit diesen Systemen wird hauptsächlich die Verdaubarkeit neuartiger Faserstoffe für die Lebensmittelindustrie, aber auch die intestinale Metabolisierung neuer Arzneistoffe getestet. Die komplexen Systeme bieten ein relativ hohes Maß an Standardisierbarkeit in präklinischen Studien und tragen sinnvoll zur Reduzierung von Tierversuchen bei. Unser Ziel des Forschungsaufenthaltes war vordergründig das Kennenlernen des Dickdarm-simulierenden Testsystems (TIM-2) sowie das Erlernen des Startens, Aufrechterhaltens und Überwachens der Kultivierungsphase, die Probennahme sowie das Arbeiten unter anaeroben Bedingungen. Weiterhin sollte die Herstellung der etablierten Nährmedien erlernt werden. Ziel der Kooperation und damit auch Benefit für TNO, war die Untersuchung des Redoxpotentials in der Bakterienflora während der Kultivierungsperiode und nach Zugabe verschiedener

Arznei- und Hilfsstoffe. Arzneistoffe wurden aus den für den Dickdarm relevanten Gruppen Antibiotika, Laxantien und Medikamente zur Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ausgewählt. Die getesteten Hilfsstoffe wurden nach ihrem absehbaren Einfluss auf Redoxsysteme ausgewählt. Die erforderlichen Arbeitstechniken wurden schnell erlernt und im Verlauf der weiteren Untersuchungen routiniert angewandt. Währenddessen wurden auch Arbeitsroutinen im GLP-Labor erlernt und praktiziert. Die Untersuchungen bestätigten die grundsätzliche Annahme eines stark reduktiven Milieus *in vitro*, das sich während der Kultivierungsphase allmählich ausbildet. Die Dauer und das Niveau des sich einstellenden Potentials sind trotz standardisierter Bakterien-Inokula variabel. Grundsätzlich ist das Potential an Tag zwei und drei der Kultivierungsphase jedoch relativ stabil. Es scheint deutlich durch metabolische Gase beeinflusst zu werden, dadurch wird das System durch die Probennahme kurzfristig gestört. Die Gesamtkapazität des Systems wird allerdings weniger durch Gase getragen und ist so groß, dass relevante Hilfsstoffmengen keinen makroskopischen Einfluss auf das Potential haben. Der Einfluss auf zellulärer Ebene muss in anschließenden Untersuchungen noch geklärt werden. Langfristiges Ziel des Erfahrungsaustausches ist der Aufbau eines einfacheren Testsystems, welches Elemente des TIM-2 und der kontinuierlichen Kolonkultur nach Bernhardt et al. verbindet und gleichzeitig deren spezifische Nachteile berücksichtigt. Damit sollen Dickdarm-spezifisch wirksame Arzneiformen aus eigenen Projekten getestet werden, die Systeme sollen aber auch der pharmazeutischen Industrie zur Testung ihrer Entwicklungskandidaten angeboten werden. Ein stabil funktionierendes Testsystem könnte insbesondere die präklinische Entwicklung beschleunigen und kostengünstiger gestalten.

- **Forschungsaufenthalt bei der Firma Astra Zeneca, Mölndal, Schweden vom 18.02. – 12.05.2012:** Der Forschungsaufenthalt bei der Firma Astra Zeneca diente der Etablierung eines *Ex vivo*-Modells innerhalb der InnoProfile-Forschungsgruppe. Dabei sollten entsprechende Versuche sowohl mit humanem als auch mit tierischem Gewebe an einer modifizierten Ussingkammer durchgeführt werden. Der Aufenthalt diente zudem neben dem Erlernen der Methode auch der möglichen Kontaktknüpfung zu industriellen Partnern mit für uns relevanten Forschungsschwerpunkten. Im Rahmen des gegebenen Zeitraums konnten sowohl Versuche an menschlichem Darmgewebe als auch an Gewebe von der Ratte durchgeführt werden. Im Einzelnen wurde dabei der transepitheliale Transport von Talinolol (β-Blocker zur Behandlung von Bluthochdruck) und Clarithromycin (Makrolidantibiotikum) über das Rattenepithel sowie eines Neuraminidasehemmers zur Behandlung der Influenza über humanes Darmepithel untersucht. Dabei standen die Arbeiten zum Transport von Talinolol und Clarithromycin in direktem Zusammenhang zu mehreren Fragestellungen mit denen sich die InnoProfile-Gruppe auseinandersetzte. Die generierten Daten stimmen mit denen von uns in *In vitro*-Modellen erhobenen Daten weitestgehend überein. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Expertise innerhalb der InnoProfile-Gruppe geschaffen wurde, die die Untersuchung an einem *Ex vivo*-Modell am Menschen und an der Ratte erlaubt. Diese Expertise soll auch über die derzeitige Projektlaufzeit hinaus genutzt werden. Die Planung eines entsprechenden Ussing-Labors wird derzeitig durchgeführt. Dabei kann die Kammer als solche nach einem Bauplan der Firma Astra Zeneca von der Feinmechanischen Abteilung der Universitätsmedizin Greifswald nachgebaut werden. Zwar gibt es auch kommerziell erhältliche Kammern, diese dienen jedoch nur unzureichend der speziellen Fragestellung des Transportes verschiedener Substanzen über das Darmepithel. Das zudem benötigte elektrische Equipment sowie eine benötigte Software zur Dokumentation der Vitalität des Gewebes kann möglicherweise vom Institut für Zoologie der Universität Göteborg, Schweden, bezogen werden. Sollte dieses jedoch aus rechtlichen Gründen seitens der Universität Göteborg nicht möglich sein, kann auf andere, kommerzielle Anbieter ausgewichen werden. Insgesamt kann der Auslandaufenthalt als überaus erfolgreich

bezeichnet werden. Neben dem Erlernen einer neuen, für uns äußerst relevanten Methode konnte ein sehr guter Kontakt zu einem international agierenden Pharmaunternehmen aufgebaut werden, welcher auch in der Zukunft bestehen bleiben soll. Zudem konnte sich die InnoProfile-Gruppe als Ganzes auch nach außen hin sehr gut präsentieren und die in den letzten Jahren aufgebauten Expertisen im analytischen, zell- und molekularbiologischem Bereich überzeugend darstellen.

- **Forschungsaufenthalt bei der Firma Pfizer, Groton, CT, USA vom 02.01. – 31.03.2012 und an der Universität Washington, Seattle, WA, USA vom 01.04.-30.06.12:** Der erster Abschnitt des Forschungsaufenthaltes wurde hierbei in den Forschungslaboren der weltgrößten Pharmafirma Pfizer in Groton, Connecticut verbracht. Thematisch stand dort während der Arbeit in der Abteilung PDM (*Pharmacokinetics and Drug Metabolism*) unter der Leitung von Dr. Yurong Lai die Massenspektrometrie-basierte Quantifizierung von Transportproteinen im Mittelpunkt. Erste Erfahrungen mit dieser Methodik wurden bereits in unserer Gruppe gewonnen, jedoch gestaltete sich die Entwicklung von final anwendbaren Messmethoden nur sehr schleppend, so dass Bedarf an externer Expertise bestand. Die erwähnte Arbeitsgruppe der Firma Pfizer nutzt seit mehreren Jahren validierte Methoden zur Quantifizierung von hepatischen Transportproteinen (z.B. ABCC2). Bei dieser Forschungsmethode wird die biologische Probe initial einem Trypsin-vermittelten Proteinverdau unterzogen. Die entstehenden Peptidfragmente des Membrantransporters können dann chromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch (LC-MS/MS) quantifiziert werden. Während des Aufenthaltes konnten Messmethoden für zehn klinisch relevante Transportproteine entwickelt werden. Nach Implementierung der Messmethoden in unserer Abteilung sind entsprechende Expressionsuntersuchungen auf Proteinebene in unserer Abteilung möglich. Der zweite Teil des Forschungsaufenthalts in den USA wurde an der *University of Washington* im *Department of Pharmaceutics* in Seattle, WA, USA verbracht. Auch in dieser Gruppe unter der Leitung des renommierten Transporter-Experten Jashvant Unadkat besteht eine große Expertise in der LC-MS/MS-basierten Quantifizierung von Proteinen. Zudem ist diese Gruppe sehr an der Erforschung der klinischen Bedeutung von Nukleosidtransportern interessiert. Demgemäß wurden während des dortigen Aufenthalts LC-MS/MS-Messmethoden für die Nukleosidtransporter ENT (*equilibrative nucleoside transporter*) 1-3 und CNT (*concentrative nucleoside transporter*) 1-3 entwickelt. Diese Methoden sollen später zur Bestimmung der intestinalen Transporterexpression genutzt werden. Ein weiteres konkretes Kooperationsfeld stellte die Nutzung von einer in der Abteilung etablierten Gewebebank (Darmproben) dar. In einem ersten Schritt wurde hierbei die mRNA isoliert und einer nachgeschalteten umfangreichen mRNA-Expressionsanalyse für 42 Gene von Metabolismus und Transport unterzogen. In einem zweiten Schritt wurde DNA aus allen Probandengeweben isoliert und einer komplexen Genotypisierung (1936 Polymorphismen in 225 Genen) unterworfen. Diese Untersuchung soll später helfen etwaige Expressionsunterschiede mit genetischen Polymorphismen zu korrelieren. Zusammenfassend stellten sich beide Aufenthalte individuell wie auch für die InnoProfile-Forschergruppe als sehr gewinnbringend und nachhaltig dar. Einerseits wurde methodisches *Know-How* erlernt, welches im C_DAT implementiert werden wird. Andererseits wurden enge Kontakte mit internationalen Experten aus den Bereichen Hochschule und Industrie geknüpft, die für zukünftige Kooperationen von großer Bedeutung sein werden. Die ersten Schritte der Fortführung der Kontakte wurden bereits unternommen. Am 14. Oktober wurde gemeinsam mit Kollegen der Firma Pfizer ein Kongress-Workshop (AAPS Annual Meeting 2012, Chicago, IL, USA) zum Thema der LC-MS/MS-basierten Quantifizierung von Transportproteinen gestaltet. Andererseits konnten wir Prof. Unadkat überzeugen am 19. Oktober 2012 einen Vortrag zu seinem Forschungsgebiet in unserem Institut und auf der Deutschen Jahrestagung für Klinische Pharmakologie (Rostock) zu halten.

Während der Projektlaufzeit wurden durch unsere Gruppe außerdem zahlreiche Weiterbildungsvorträge mit international renommierten Referenten organisiert. Diese Veranstaltungen standen Mitarbeitern der beteiligten Arbeitsgruppen, unseren KMU-Partnern und Mitarbeitern des gesamten Klinikums bzw. der Universität offen. Folgende Tabelle 6 fasst die organisierten Weiterbildungsvorträge unserer Gruppe zusammen.

Tabelle 6: Übersicht der im Rahmen des InnoProfile-Projektes organisierten Weiterbildungsvorträge

Referent	**Thema**	**Datum**
Prof. Dr. Tetsuya Terasaki, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan	Quantitative Proteomics as A New Path for the Drug Discovery and Development	13.09.07
Dr. Ralf Ehret, Bionas GmbH, Rostock	Analysesystem zur kontinuierlichen Bestimmung der Zellphysiologie	28.09.07
Prof. Dr. Wolfgang Löscher, Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie	Efflux-Transporter und Pharmakoresistenz bei Epilepsien: kausaler Zusammenhang oder Epiphänomen?	26.10.07
PD Dr. Christiane Albrecht, Institut für Biochemie und Molekulare Medizin, Universität Bern, Schweiz	Der Cholesterintransporter ABCA1 - neue Zusammenhänge zwischen Apoptose, Arteriosklerose und Hämostase	30.11.07
Prof. Dr. Gert Fricker, Abteilung Pharmazeutische Technologie und Pharmakologie, Universität Heidelberg	Expression und Funktion von Transportproteinen an der Blut-Hirn-Schranke	14.12.07
Dr. Mikko Niemi, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Universität Helsinki, Finnland	Relevance of hepatic uptake organic anion transporting polypeptides (OATPs) for the disposition and efficacy of drugs	18.01.08
Dr. Oliver Goldenberg, Transgenomic Ltd. & Dr. Olaf Schüler, Hämatologie und Onkologie, Universität Greifswald	Theorie und Praxis der DHPLC: Ein innovatives Verfahren zur Detektion von genetischen Polymorphismen	29.02.08
Prof. Dr. Joachim Geyer, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Justus-Liebig-Universität Gießen	Die Familie der SLC-Transporter	11.04.08
Dr. Hristos Glavinas, Solvo Biotechnology, Budapest, Ungarn	High throughput cellular and membrane assays in drug-transporter interaction research	9.05.08
Prof. Dr. Jörn Lötsch, Institut für Klinische Pharmakologie, Johann-Wolfgang-Goethe Universitär Frankfurt	Klinische Pharmakologie von Analgetika unter besonderer Berücksichtigung der Rolle transmembranärer Transporter	23.05.08
Tobias Parikh, Patentverwertungsagentur MV AG, Rostock	Die Besonderheiten des Patentrechts in der Life-Science- Branche	11.07.08
Dr. Krassimira Ivanova, Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR), Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin, Köln	Melanocytes: interface of cell biology and pathobiology with a focus on nitric oxide and cGMP signaling	24.10.08
Prof. Dr. Urs Meyer, Biozentrum der Universität Basel	Genomik in der Medizin: Herausforderungen und Möglichkeiten	20.11.08

Prof. Dr. Marion Schäfer, Institut für Klinische Pharmakologie der Humboldt-Universität / Charité Berlin	Erfassung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen in der ambulanten Betreuung	03.12.08
Prof. Dr. Heidrun Potschka, Institut für Pharmakologie, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München	Regulation von P-glycoprotein im epileptischen Gehirn	27.02.09
Prof. Dr. Edward Högestätt, Department of Clinical and Experimental Pharmacology, Lund University Hospital, Sweden	Role of TRP ion channels in noxious chemosensation	13.03.09
Prof. Dr. Gerd Mikus, Abteilung für Klinische Pharmakologie & Pharmakoepidemiologie, Universitätsklinikum, Heidelberg	Interaktionen auf Transporter- und Enzymebene - Erkenntnisse zu Efavirenz	03.04.09
PD Dr. Michael Lalk, Abteilung für Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie & Baltic Analytics GmbH, Greifswald	Metabolomics - Was ist das und wozu ist es gut?	14.07.09
Dr. Arlene McDowell, National School of Pharmacy, University of Otago, New Zealand	Formulating biocontrol agents for wildlife - a case of the brushtail possum in New Zealand	24.07.09
Prof. Dr. Chris King, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA	New treatment for malaria	29.07.09
Prof. Dr. Dr. Dieter Lütjohann, Institut für Klinische Chemie und Pharmakologie, Universitätsklinikum Bonn	Biochemische Marker des Cholesterolstoffwechsels als Surrogatparameter in Klinischen Studien: Möglichkeiten und Grenzen	18.09.09
Dr. Dieter Becker, Pharmaceutical & Analytical Development PDU1, Norvatis Pharma AG	From Pill to PK or from PK to Pill? Approaches for increasing solubility and dissolution rate of poorly soluble drugs Poorly soluble Drug Market & Predictive PK animal to man scaling	09.10.09
Prof. Dr. Jobst Limberg, Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn	Validierung analytischer Prüfverfahren, ein Überblick	29.04.10
Prof. Dr. Jobst Limberg, Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn	Quality by Design - Die pharmazeutische Qualität im Zulassungsverfahren und mögliche Auswirkungen des neuen Denkansatzes	30.04.10
Prof. Marija Bogataj, Institut für Pharmazie, Universität Ljubljana, Slovenien	Implementation of knowlegde on solid dosage forms behaviour in GI tract in *in vitro* dissolution testing	07.05.10
PD. Dr. Jörg König, Institut für Pharmakologie, Universität Erlangen-Nürnberg	Drug Transporters: Pharmacogenetic aspects and their Role in Drug-Drug Interactions	19.05.10
Prof. Bruno Stieger, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsspital Zürich	Organic anion transporters: Entry sites for drugs into hepatocytes	16.07.10
Prof. Dr. Tetsuya Terasaki, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan	A New Path to Pharmaco-Proteomics: Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP) for the Drug Development and Clinical Application	11.04.11
Dr. Klaus Steube, Deutsche Sammlung von Mikro-Organismen und Zellkulturen, Braunschweig	Zellkultur in der Praxis: Charakterisierung und Qualitätskontrolle menschlicher und tierischer Zelllinien am DSMZ	24.06.11
Prof. Gerd Kullak-Ublick, Klinik für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität Zürich	Rolle von hepatischen Transportproteinen bei medikamentösen und cholestatischen Leberschäden	15.07.11

Prof. Dr. Martin Wickham, Leatherhead Food Research, Letherhead, Surrey	How to model stomach function	28.09.11
Prof. Dr. Gerhard Burckhardt, Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie, Universitätsmedizin Göttingen	Bedeutung von OATs für die Arzneimitteltherapie	14.10.11
Dr. Axel Landgraf, mysample GmbH, Langenhagen	Biobanking - Optimierte Verwaltung von Tiefkühlproben	17.01.12
Dr. Thorsten Halbach, MACHEREY-NAGEL, Düren	Nucleic acid purification kits - Just a black box?	09.05.12

Des Weiteren organisierten wir während der Projektlaufzeit drei Forschungssymposien mit nationalen und internationalen Referenten (Programm-Flyer der Veranstaltungen sind als Anlagen eingefügt):

- "*In vitro models in transporter research: possibilities and limitations"*, 30.09. – 01.10. 08, Schlemmin
- "*Drug Delivery Technologies to optimize the clinical application of drugs*", 01.-02.07.10, Greifswald
- "*Center of Drug Absorption and Transport (C_DAT): From concepts to patients - A symposium on behalf of the opening of the new research building*", 24.-25.11.11, Greifswald

Die genannten Veranstaltungen haben neben der Weiterbildung der Mitarbeiter und KMU-Kollegen und der Profilbildung unserer Gruppe innerhalb der Universität / des Klinikums auch maßgeblich zur nationalen und internationalen Vernetzung unserer Gruppe beigetragen.

Zur Umsetzung unserer Projektziele wurde uns die Anschaffung mehrerer Forschungsgeräte genehmigt. Alle im Rahmen des Projektes getätigten Investitionen wurden zeitnah getätigt und gemäß der nachfolgenden Beschreibungen intensiv für die Projektarbeit genutzt.

- **12-Kanal Lichtleiter-Dissolutionssytem:** Dieses Lichtleiter-Dissolutionssytem ist integraler Bestandteil der im Rahmen des InnoProfile-Projektes entwickelten Physiologie-basierten Freisetzungsapparatur. Sie ermöglicht die simultane spektroskopische Analyse der *in vitro* freigesetzten Arzneistoffmenge aus der Arzneiform. Die genannte Freisetzungsapparatur nebst dem dazugehörigen Lichtleitersystem wurde während des Projektes intensiv zur Charakterisierung der Freisetzungseigenschaften von neu entwickelten *Drug Delivery*-Systemen genutzt und stellte den ersten Meilenstein unseres Projektes dar.
- ***Real-time* PCR-Gerät (TaqMan):** Das *real-time* PCR-Gerät ermöglicht eine spezifische und sensitive Genexpressionsanalyse im Hochdurchsatz (komplexe Simultanmessungen möglich). Derartige Untersuchungen waren essentieller Bestandteil der im Rahmen von InnoProfile durchgeführten Expressionsmessungen in biologischen Geweben und Mikrokompartimenten. Zudem war das erworbene Gerät unverzichtbar für die Charakterisierung der Genexpression in unseren zellulären Transportermodellen.
- **HPLC mit DAD-Detektor (LaChrome Elite):** Das Gerät wurde angeschafft, um Arzneistoffkonzentrationen in biologischen Matrizes und in Proben aus *In vitro*-Untersuchungen quantifizieren zu können. Hierfür wurde das Gerät während des Projektes intensiv genutzt. Neben der Auswertung von zellulären Transportstudien wurde das System auch benötigt, um die Freigabe von Arzneistoffen aus entwickelten *Drug Delivery*-Systemen zu charakterisieren.

- **LC-MS/MS-System (API4000 QTRAP):** Dieses Analysesystem ermöglichte die Quantifizierung von Transporterproteinen aus komplexen biologischen Proben (z.B. Zelllinien, Darmbiopsien). Diese Methodik wurde während des InnoProfile-Projektes in unserer Gruppe etabliert und für erste Messungen der Proteinexpression in Zellen genutzt. Anstehende Untersuchungen im Rahmen des genehmigten COM_DAT-Projektes werden ebenfalls mit diesem Gerät erfolgen (Expression pharmakokinetisch relevanter Transporterproteine in Darm, Leber, Niere). Zudem ermöglichte das LC-MS/MS-System auch die hochspezifische und hochempfindliche Quantifizierung von Arzneistoffmolekülen in biologischen Proben. Dieses Gerät kam dann zum Einsatz, wenn das zuvor beschriebene HPLC-System an seine analytischen Grenzen stieß.
- **Durchflusszytometer mit Zellsortierfunktion (BD FACS Aria II):** Das genannte Gerätesystem wurde im abgeschlossenen InnoProfile-Projekt intensiv zur Charakterisierung und Auftrennung von Zellpopulationen in bronchoalveolären Lavage-Proben von Fohlen genutzt. Des Weiteren kam es zur Auftrennung von Blutzellen zum Einsatz. Das Gerät war somit unverzichtbar, um die Fragenstellungen der pharmakologisch relevanten Mikrokompartimente aufzuklären. Diese Untersuchungen werden auch im COM_DAT-Projekt kontinuierlich mit unserem KMU-Partner Paul-Schockemöhle-Pferdehaltung fortgesetzt.
- **Atomabsorptionsspektrometer (contrAA 700):** Das angeschaffte Atomabsorptionsspektrometer wurde während der Projektlaufzeit intensiv zur Quantifizierung von Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln in zellulären und Proben aus klinischen Studien (Serum, Urin) genutzt. Diese Kontrastmittel erbrachten unserer Gruppe tiefe Einblicke in intestinale und hepatische Transportprozesse. Des Weiteren wurde das Gerät intensiv genutzt, um in Kooperationsprojekten die zelluläre Aufnahme von Eisen aus *Drug Delivery*-Systemen zu bestimmen.
- **Elektronenmikroskop (Phenom Table Top) inclusive Sputteranlage (Polaron**): Neu entwickelte *Drug Delivery*-Systeme besitzen häufig Spezialüberzüge aus pharmazeutischen Hilfsstoffen bzw. wirkstoffhaltigen Überzüge. Um eine homogene und reproduzierbare Arzneistofffreigabe aus diesen *Drug Delivery*-Systemen zu gewährleisten, ist ein dichter und einheitlicher Filmüberzug unabdingbar. Das erworbene Elektronenmikroskop inklusive Sputteranlage ermöglichte unserer Gruppe die intensive Charakterisierung derartiger Tablettenüberzüge (z.B. Dicke und Porosität) und war somit von großer Bedeutung für unser Projekt.

2.3 Nutzen bzw. Verwertbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse

Wie unter Punkt 2.1 ausführlich dargestellt, konnte unser Projekt die folgenden wesentlichen Ergebnisse erzielen:

1. Entwicklung einer Physiologie-basierten Liberationsapparatur für orale Arzneiformen
2. Entwicklung, Charakterisierung und funktionelle Validierung einer komplexen zellulären Transporterplattform für nahezu alle klinisch relevanten Transporter und deren funktionell bedeutsamen genetischen Varianten
3. Entwicklung innovativer *Drug Delivery*-Systeme (insbesondere pulsatile, gastroretentive und drucksensitive Arzneiformen zur gezielten intestinalen Arzneistofffreisetzung)
4. Charakterisierung der Expression, Regulation und Funktion von Transporterproteinen in pharmakologisch bedeutsamen Mikrokompartimenten (alveoläre Makrophagen, Herzmuskelzellen, Thrombozyten, Plazenta).

Die Entwicklung des physiologischen ***In vitro*-Liberationssystems** für orale *Drug Delivery*-Systeme mit kontrollierter Freisetzung versetzte unsere Gruppe in die Lage, dass *In vivo*-

Freisetzungsverhalten von marktgängigen Arzneiformen simulieren bzw. vorhersagen zu können. Mit diesem Modell lassen sich physiologische Einflüsse wie Peristaltikdruck und Verweilen in Wassernestern des Darmes simulieren und somit unregelmäßige Absorptionsprozesse beim Menschen vorhersagen. Das Modell stellte seine funktionelle Eignung an zahlreichen oralen Arzneiformen unter Beweis (z.B. Garbacz et al., Eur J Pharm Biopharm. 2008;70:421 and Eur J Pharm Sci 2009;38:147; Garbacz and Weitschies**,** Drug Dev Ind Pharm. 2010;36:518, Garbacz and Klein, J Pharm Pharmacol. 2012; 64:944).
Bisher gab es am Markt kein derartiges Freisetzungssystem. Andererseits besteht seitens der Pharmazeutischen Industrie ein großes Interesse an der Prädiktion der oralen Absorption von Arzneistoffen aus ihren Arzneiformen, da dies ein Schlüsselkriterium für die Vermarktungsfähigkeit eines Arzneimittels darstellt.

Aufgrund des großen Interesses seitens der pharmazeutischen Industrie an der entwickelten Freisetzungsapparatur für orale Arzneiformen ist es gelungen, am 26.11.2009 das Spin-Off Unternehmen „Physiolution GmbH“ zu gründen. Die Physiolution GmbH bietet neben der Entwicklung und Evaluierung von Freisetzungstestgeräten für spezielle Anwendungen unter anderem auch die präklinische Untersuchung des Freisetzungsverhaltens von festen oralen Darreichungsformen unter biorelevanten Testbedingungen an. Zusätzlich wird die Firma Erweka GmbH in Kooperation ein modifiziertes Freisetzungstestgerät auf den Markt bringen.

Mit dem entwickelten Freisetzungssystem steht allen Arbeitsgruppen im C_DAT und allen beteiligten KMU-Partnern (z.B. Riemser Arzneimittel AG) ein neuartiges, pharmazeutisch-technologisches Werkzeug für zukünftige Entwicklungsvorhaben von *Drug Delivery*-Systemen zur Verfügung. Forschungserkenntnisse, die im vorliegenden InnoProfile-Projekt mit Hilfe dieser Apparatur gewonnen wurden, werden im bereits genehmigten InnoProfile-Transfer-Projekt „*Compartmental Drug Absorption and Transport*“ (COM_DAT) weiter ausgebaut (z.B. Entwicklung von Freisetzungssystemen für den Magen). Hierbei werden aller Wahrscheinlichkeit nach auch vermarktungsfähige Prinzipien entwickelt werden.

Durch die Entwicklung der komplexen **Transporterplattform** ist unsere Gruppe in der Lage alle international akzeptierten Assays zur *In vitro*-Charakterisierung der Transporteigenschaften von Arzneistoffen durchzuführen (Transwell™, Lipovesikelassays, Uptake-Assays, Kompetitionsassays, Regulationsstudien etc.). Die Funktionalität und Eignung dieser Untersuchungsplattform für die Charakterisierung der Transporteraffinität von Arzneistoffen wurde in zahlreichen Projekten belegt (z.B. Venner et al., Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2010;381:161; Leonhardt et al., Drug Metab Dispos 2010;38:1024; Hanke et al., Eur J Pharm Biopharm 2010;76:260; Oswald et al., Clin Pharmacol Ther 2011;89:524; Peters et al., Drug Metab Dispos 2011;39:1643 und 2012;40:522, Nassif et al., Radiology 2012;264:741, Engel et al., Mol Pharm 2012;9:2577, Koenen et al., Eur J Pharm Sci 2012;47:774).

Im Gegensatz zu üblicherweise im universitären Umfeld generierten Zellmodellen wurden unsere Zellmodelle in einheitlichen Zelllinien erstellt (HEK293, MDCKII) und einheitlich nach C_DAT-internen Standardverfahren validiert. Hierbei wurde in Anlehnung an andere industrielle Standards wie GLP (*Good Laboratory Practice)* und GCP (*Good Clinical Practice)* ein internes GCCP (*Good Cell Culture Practice*)-Konzept entwickelt. Die Zellmodelle sind somit marktfähige Forschungsplattformen und vergleichbar mit Produkten der Privatwirtschaft (z.B. SOLVO Biotechnology). Das *Know-How* dieser Zellmodelle wurde bei unserem KMU-Partnerunternehmen PRIMACYT eingebracht und bereichert das Firmenportfolio beträchtlich (Charakterisierung der Transportfunktion von Leberzellen).

Das Potential für Aus- und Neugründungen für diese Zellplattform wurde im Rahmen des vom BMBF initiierten ForMaT-Projektes „TransPharm-Transferpotenziale in der Arzneimittelforschung“ ausgelotet. Allerdings scheiterte unser Folgeantrag für die zweite Phase des Projektes (Entwicklung eines MRP4-Antagonisten). Wir bemühen uns derzeit um andere Finanzierungsmöglichkeiten für dieses Projekt. Im aktuellen COM_DAT-Projekt bildet diese valide Transporterplattform eine elementare Grundsäule (PB1).

Während der Projektlaufzeit wurden neuartige ***Drug Delivery*-Systeme** entwickelt, mit deren Hilfe man Arzneistoffe mit bisher unzureichender systemischer Aufnahme (Bioverfügbarkeit) gezielt in Bereiche des Magen-Darm-Traktes mit optimalen Bedingungen zur Aufnahme bringen kann. Dabei wurden auch wesentliche neue Erkenntnisse über physiologisch bedeutsame Bedingungen für die Freisetzung der Wirkstoffe aus den Applikationssystemen (z.B. Verfügbarkeit von Lösungswasser) sowie für ihre Aufnahme durch Transporter in der Darmwand gewonnen (z.B. regio-selektive Expression). Einen Schwerpunkt stellte hierbei insbesondere die Entwicklung von pulsatilen, gastroretentiven und drucksensitiven Arzneiformen zur gezielten Arzneistofffreisetzung im Magen, Dünndarm bzw. Kolon dar. In diesem Zusammenhang konnten wir zwei Prinzipien patentieren lassen. Dieses *Know-How* ist für regionale Unternehmen im Bereich der Arzneimittelherstellung mit begrenzten Forschungsressourcen im Bereich der Galenik von großer Bedeutung (Riemser Arzneimittel AG, Physiolution GmbH, bmp GmbH).

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Expression, Regulation und Funktion von **Transportern in zellulären Kompartimenten** versetzen uns in die Lage die pharmakokinetischen Prozesse am Ort der Wirkung eines Arzneimittels besser zu verstehen bzw. vorhersagen zu können. Dieses Wissen wird im aktuellen InnoProfile-Transfer-COM_DAT weiter ausgebaut, um die funktionelle Bedeutung für die Anreicherung von Arzneimitteln zu untersuchen (PB4, Arzneistofftransporter in Mikrokompartimenten der Lunge; PB5, Arzneistofftransport im kardiovaskulären System). Langfristig, soll dieses Wissen in neue bzw. optimierte Therapieprotokolle überführt werden, die das Wissen der Transporterfunktion therapeutisch sinnvoll berücksichtigen (z.B. *boostering*, Vermeidung von Interaktionen).

2.4 Fortschritte auf dem Forschungsgebiet während des Vorhabens

Im Bereich der „**Transportermodelle**“ ergaben sich im Wissensgebiet moderate Fortschritte, die jeweils in unserem Arbeitsplan berücksichtigt wurden. So wurden beispielweise neue genetische Varianten von OATP-Transportern als funktionell bedeutsam erkannt und nachfolgend in unserer Zellplattform etabliert. Zudem wurden innerhalb der Projektlaufzeit über 20 neue Transporter aus der Familie der *solute carrier* identifiziert, zu denen auch die von uns untersuchten Aufnahmetransporter gehören. Als Folge dessen wurden nomenklatorisch drei neue Unterfamilien definiert. Da sich das Gebiet der Transporterforschung als hoch aktiv und unübersichtlich gestaltet, wurde als folgerichtige Konsequenz ein Konsenspapier (*White Paper*) über die klinisch relevanten Transporter und deren bedeutsamen genetischen Varianten vom Internationalen Transporterkonsortium (ITC) veröffentlicht (Giacomini et al. Nat Rev Drug Discov. 2010,9:215). Hiernach wurden insbesondere die Transporter als bedeutsam eingestuft, für die wir bereits gut charakterisierte Zellmodelle vorhalten (z.B. ABCB1, OATPs, OCTs). Für den als bedeutsam eingestuften Transporter OATP1A2 ist weltweit lediglich in unserer und einer japanischen Gruppe ein Zellmodell vorhanden.

Im Bereich der „***Drug Delivery*-Systeme**“ sind uns in Bezug auf die Verfügbarkeit von biologisch relevanten Freisetzungssystemen wenige Fortschritte bekannt geworden. Ein dynamisches Magenmodell (*Dynamic Gastric Model*), welches während der Projektlaufzeit erstmals publiziert wurde, erlaubt die hydrodynamischen Bedingungen des Magens nüchtern und nach Nahrungsaufnahme zu simulieren. Dabei wird auch der Einfluss von Verdauungsenzymen berücksichtigt. Dr. Martin Wickham als einer der Mitentwickler dieses Systems konnte für einen Weiterbildungsvortrag in unserer InnoProfile-Gruppe eingeladen werden. Ein weiteres sehr einfaches System zur Simulation der mechanischen Beanspruchung einer Arzneiform wurde an der Universität Ljubljana entwickelt und zum Patent angemeldet (WO 2010014046 A1). Auch Frau Prof. Marija Bogataj konnte für einen Vortrag nach Greifswald eingeladen werden. Diese Systeme gehen teilweise in die Planung spezieller Testsysteme ein, die im InnoProfile-Transfer-Projekt COM_DAT für einzelne Abschnitte des Magen-Darm-Traktes entwickelt werden.

Im Bereich Arzneiformen mit innovativer Wirkstofffreigabecharakteristik wurden diverse Ideen publiziert. Ein zu Beginn des Projektes sehr vielversprechendes selbstentfaltendes gastroretentives System (Kagan et al., J. Control. Release 2006;113:208) ist bei der klinischen Prüfung durchgefallen. Eine erfolgreiche pulsatile Formulierung der Firma Mundipharma GmbH (Lodotra®) wurde 2009 zugelassen. Die Tablette zur Behandlung morgendlicher Gelenksteifigkeit bei rheumatoider Arthritis setzt den enthaltenen Arzneistoff Prednison nach einer Lag-Zeit von etwa 4 Stunden unabhängig von der Nahrungsaufnahme pulsatil frei (Buttgereit et al., Lancet 2008;371:205). Weitere Entwicklungen sind uns nicht bekannt geworden.

2.5 Veröffentlichung der Ergebnisse

Tagungsbeiträge (Poster & Vorträge)

1. Hentschel et al., DGPT Tagung 2012, March 19-22 2012, Dresden: Regulation of gene expression of urate transporter SLC2A9 (Poster)
2. Keiser et al., American Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics - Annual Meeting, March 12-17 2012, National Harbor, USA: Affinity of the bladder spasmolytic trospium chloride to drug transport proteins (Poster)
3. Drozdzik et al., American Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics - Annual Meeting, March 12-17 2012, National Harbor, USA: Expression of drug metabolizing enzymes and transporter proteins along the entire human gastrointestinal tract (Vortrag)
4. Nassif et al., American Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics - Annual Meeting, March 12-17 2012, National Harbor, USA: Efficacy of oral and subcutaneous methylnaltrexone to prevent loperamide-induced constipation in healthy subjects (Poster)
5. Garbacz et al., AAPS Annual Meeting and Exposition, October 24-27 2011, Washington D.C., USA: Evaluation of the dissolution behavior of tianeptine sodium 12.5 mg immediate release tablets (Coaxil®) under standard and biorelevant stress test conditions (Poster)
6. Garbacz et al., AAPS Annual Meeting and Exposition, October 24-27 2011, Washington D.C., USA: An oral controlled release drug delivery system for valproic acid as a model liquid drug (Poster)
7. Nassif et al., 13. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, October 20-22 2011, Zürich, Switzerland: Loperamide-induced constipation in healthy subjects – an experimental model to evaluate the anti-constipation effect of methylnaltrexone (Poster)
8. Peters et al., 13. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, Oktober 20-22 2011, Zürich, Switzerland: Expression of drug transport proteins in peripheral blood monocytes, bronchoepithelial cells, nasal epithelial cells and alveolar macrophages in healthy volunteers (Poster)
9. Engel et al., 13. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, Oktober 20-22 2011, Zürich, Switzerland: Influence of solubilizing agents on the function of human organic anion uptake transport proteins (Poster)
10. Keiser et al., 13. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, Oktober 20-22 2011, Zürich, Switzerland: The role of OATP1A2, OCT1 and ABCB1 on trospium chloride transport in vitro (Poster)
11. Hubeny et al., RNAi & miRNA Europe, September 08-09 2011, München: Gestational changes in microRNA expression in human placenta (Poster)
12. Keiser et al., BioMedical Transporters 2011, August 07-11, Grindelwald, Switzerland: Influence of solubilizing agents on the function of human organic anion uptake transporter polypeptides (Poster)
13. Glöckl et al., 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 30 - August 3, 2011, National Harbor, Maryland, USA: A formulation approach to improve the *in vivo* performance of furosemide (Poster)
14. Garbacz et al., 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 30 - August 3, 2011, National Harbor, Maryland, USA: Dissolution of pioglitazone 45 mg tablets under conditions simulating standard fasting conditions of bioequivalence studies (Poster)
15. Haznar-Garbacz et al., 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 30 - August 3, 2011, National Harbor, Maryland, USA: An oral controlled release drug delivery system for liquid and semisolid drug formulations (Poster)
16. Nassif et al., 10th EACPT Congress, 26-29 June 2011, Budapest, Hungary: Loperamide-Induced Constipation in Healthy Subjects - A Model to Evaluate the Laxative Effect of Methylnaltrexone (Poster)

17. Jia et al., 10th EACPT Congress, 26-29 June 2011, Budapest, Hungary: Gd-Eob-Dtpa Is A Substrate of Abcc2, Oatp1B1 and Oatp1B3 and Their Genetic Variants (Vortrag)
18. Keiser et al.,13. Herrenalber Transportertage, May 30-June 1 2011, Bad Herrenalb: Trospium chloride is a substrate of OATP1A2 and OCT1 (Poster)
19. Oswald et al., Proteomic Forum 2011, April 03-07 2011, Berlin: Comparison of absolute protein quantification by Western blot and MRM-based mass spectrometric analysis (Poster)
20. Engel et al., Doktorandentagung der DPhG, March 30-April 02 2011, Heringsdorf: Influence of solubilizing agents on the function of uptake transport proteins in vitro and *in vivo*
21. Peters et al., Doktorandentagung der DPhG, March 30-April 02 2011, Heringsdorf: Oral absorption of clarithromycin is nearly abolished by chronic comedication of rifampicin in foals (Poster)
22. Garbacz et al., ADMET Europe Conference and Exhibition, March 28-29 2011, München: Dissolution test device simulating standard fasting conditions of bioequivalence studies (Poster)
23. Garbacz et al., ADMET Europe Conference and Exhibition, March 28-29 2011, München: Dissolution of Quetiapine ER tablets under bio-relevant stress conditions (Poster)
24. Engel et al., Controlled Release Society-Tagung, March 15-16 2011, Jena: Influence of solubilizing agents on the function of human organic anion uptake transport proteins (Poster)
25. Oswald et al., American Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics - Annual Meeting, March 02-05 2011, Dallas, USA: Influence of Roux-en-Y gastric bypass surgery on the disposition of paracetamol, talinolol and amoxicillin in obese patients (Poster)
26. Naddaf et al., 12. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, November 04-06 2010, Würzburg: In vitro effects of intestinal and hepatic uptake transporters on talinolol uptake (Poster)
27. Nassif et al., 12. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, November 04-06 2010, Würzburg: Hepatic Uptake and Pharmacokinetics of the MRI Contrast Agent Gadoxetate in Healthy Subjects, Role of OATP1B1, OATP1B3 and ABCC2
28. Peters et al., Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2010, October 04-07 2010, Braunschweig: Influence of Roux-en-Y gastric bypass surgery on the pharmacokinetics of paracetamol, talinolol and amoxicillin in obese patients (Vortrag)
29. Oswald et al., Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2010, October 04-07 2010, Braunschweig: Impact of efavirenz on intestinal and hepatic metabolism and transport: Interaction study with ezetimibe in healthy volunteers (Vortrag)
30. Glöckl et al., Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2010, October 04-07 2010, Braunschweig: Development of a gastro-retentive extended release formulation of furosemide (Poster)
31. Koenen et al., 9th International Meeting of the Society for the Study of Xenobiotics, September 04-08 2010, Istanbul, Turkey: Effect of Steroids on Transport Characteristics of the Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP) 1A2, 1B1, 1B3 and 2B1 (Poster)
32. Grube et al., 9th International Meeting of the Society for the Study of Xenobiotics, September 04-08 2010, Istanbul, Turkey: Characterization of Placental SLC22A4 (OCTN1) and SLC22A5 (OCTN2) Expression: Influence of Genotype and Gestation Age (Poster)
33. Oswald et al., 9th International Meeting of the Society for the Study of Xenobiotics, September 04-08 2010, Istanbul, Turkey: Efavirenz induces hepatic and peripheral but not intestinal target genes of CAR (Poster)
34. Peters et al., 9th International Meeting of the Society for the Study of Xenobiotics, September 04-08 2010, Istanbul, Turkey: Influence of Roux-en-Y gastric bypass surgery on the pharmacokinetics of paracetamol, talinolol and amoxicillin in obese patients (Poster)
35. Oswald et al., 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, July 17-23 2010, Copenhagen, Denmark: Influence of efavirenz on the disposition and lipid-lowering effects of ezetimibe in healthy subjects (Poster)
36. Peters et al., 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, July 17-23 2010, Copenhagen, Denmark: Influence of rifampicin on pulmonary expression of ABCB1 and ABCC2 and on distribution of clarithromycin into epithelial lining fluid and broncho-alveolar cells of foals (Poster)
37. Kühn et al., American Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics - Annual Meeting, March 17-20 2010, Atlanta, USA: Influence of OATP1B1, OATP1B3 and ABCC2 on the hepatic uptake of Primovist in healthy volunteers (Vortrag)
38. Schwabedissen et al., American Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics - Annual Meeting, March 17-20 2010, Atlanta, USA: Efavirenz induces expression of CAR target genes in hman PBMCs (Poster)

39. Oswald et al., American Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics - Annual Meeting, March 17-20 2010, Atlanta, USA: Drug interactions between ezetimibe and efavirenz in healthy subjects (Vortrag)
40. Glöckl et al., 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, March 08-11 2010, Valletta, Malta: Development of a gastro-retentive extended release formulation of furosemide. (Vortrag)
41. U. Hanke et al., 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, March 08-11 2010, Valletta, Malta: Development of a pulsatile dosage form containing dipyrone
42. Peters et al., Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2009, September 28 – October 1 2009, Jena: Influence of rifampicin on the disposition of clarithromycin and the distribution into epithelial lining fluid and broncho-alveolar cells of foals (Vortrag)
43. Leonhardt et al., BioMedical Transporters 2009, 9-13 August 2009, Thun, Switzerland: Meglumine iotroxate (Biliscopin) interacts with the human hepatic uptake transport protein OATP1B3 in vitro (Poster)
44. Peters et al., BioMedical Transporters 2009, 9-13 August 2009, Thun, Switzerland: Influence of rifampicin on pulmonary pharmacokinetics of clarithromycin and expression of ABCB1 and ABCC2 in broncho-alveolare cells of foals (Poster)
45. Keiser et al., BioMedical Transporters 2009, 9-13 August 2009, Thun, Switzerland: Gd-EOB-DTPA is a substrate of the liver specific organic anion transporters OATP1B1 and OATP1B3 (Poster)
46. Hanke et al., 36th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 19-23 2009, Kopenhagen, Denmark: Pharmaceutical surfactants interact differently with the human efflux transporters ABCB1 and ABCC2 (Vortrag)
47. Glöckl et al., 36th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 19-23 2009, Kopenhagen, Denmark: Yeast containing minitablets for modified drug release (Poster)
48. Leonhardt et al., 11th European Meeting of the Society for the Study of Xenobiotics, May 17-20 2009, Lisbon, Portugal: In vitro uptake of the MRI contrast agent gadoxetate (Gd-EOB-DTPA) by the human uptake carrier OATP1B1 (Poster)
49. Scheuch et al. FASEB EB Meeting, April 18-22 2009, New Orleans, USA: Metabolism of the analgesic flupirtin in man (Poster)
50. Oswald et al., American Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics - Annual Meeting, March 18-21 2009, Washington, USA: Lack of significant drug interactions between ezetimibe and tacrolimus in healthy subjects (Poster)
51. Oswald et al., 10. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, November 6-8 2008, Berlin, Germany: Lack of significant drug interactions between ezetimibe and tacrolimus in healthy subjects (Poster)
52. Rimmbach et al., 10. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, November 6-8 2008, Berlin, Germany: Genetic variants in the insulin-induced gene 2 (INSIG2) and the risk for obesity – efffects of a novel promoter variant (Poster)
53. Scheuch et al., 10. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, November 6-8 2008, Berlin, Germany: The role of UGT-isoforms in metabolism of flupirtin (Poster)
54. Glöckl et al., Benediktbeurer Rundgespräche 2008, September 24-26 2008, Benediktbeuern, Germany: Magnetische Nanopartikel: Perspektiven und Hindernisse auf dem Weg zum Arzneimittel oder Medizinprodukt (Vortrag)
55. Leonhardt et al., 35th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 12-16 2008, New York USA: Influence of pharmaceutical surfactants as Modulators of the efflux transporter P-glycoprotein (Poster)
56. Glöckl et al., 7th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, May 21-24 2008, Vancouver, Canada: Magnetic Drug Targeting to the Lung: Preliminary In vitro Investigations (Poster)
57. Oswald et al., 10th European Meeting of the Society for the Study of Xenobiotics, May 18-21 2008, Vienna, Austria: Lack of significant parmacokinetic interactions between the ABCB1 substrates sirolimus and ezetimibe in healthy subjects (Poster)
58. Siegmund et al. 10th European Meeting of the Society for the Study of Xenobiotics, May 18-21 2008, Vienna, Austria: Clinical-Pharmacological Approaches to Confirm the Role of Intestinal Metabolism and Transport in Disposition of Drugs (Vortrag)
59. Grube et al., 10th European Meeting of the Society for the Study of Xenobiotics, May 18-21 2008, Vienna, Austria: Expression of drug-uptake transporters in normal and dilative hearts (Poster)
60. Koeck et al., 10th European Meeting of the Society for the Study of Xenobiotics, May 18-21 2008, Vienna, Austria: Regulation of OATP2B1 trafficking by protein kinase C (Poster)

61. Adam et al., 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, April 7-10 2008, Barcelona, Spain: Interaction of pharmaceutical surfactants with the human efflux transporters P-glycoprotein and MRP2 (Vortrag)
62. Oswald et al, American Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics - Annual Meeting, April 2-5 2008, Orlando, USA: Drug interactions between the immunosuppressant sirolimus and the cholesterol-lowering agent ezetimibe in healthy subjects (Poster)
63. Keiser et al., 2nd FEBS Special Meeting on ABC Proteins, March 1-8 2008, Innsbruck, Austria: Rifampicin regulates Abcb1 and Abcc2 and influences accumulation of the macrolide antibiotic tulathromycin in broncho-alveolar cells of healthy foals (Poster)
64. Oswald et al., 9. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, November 1-3 2007, Kiel, Germany: Disposition of sirolimus is not influenced by comedication of ezetimibe in healthy subjects (Poster)
65. Scheuch et al., 9. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, November 1-3 2007, Kiel, Germany: Metabolic disposition of flupirtin in man assessed by LC-MS and HRMS (Poster)
66. Oswald et al., 8th International Meeting of the Society for the Study of Xenobiotics, October 9-12 2007, Sendai, Japan: Pregnancy-related changes, fetal development and postnatal maturation of ABCB1 and ABCC2 in rats (Poster)
67. Grube et al., 8th International Meeting of the Society for the Study of Xenobiotics, October 9-12 2007, Sendai, Japan: Function of OATP2B1 in drug transport (Poster)
68. Glöckl et al., European Summer School, September 3-8 2007, St Etienne, France: Magnetic Nanoparticles in Medicine: Characterization and Future Applications of Magnetic nanoparticles, composite materials and optical applications (Vortrag)
69. Oswald et al., 8th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, August 29th - 1 September 2007, Amsterdam, The Netherlands: Bioavailability of immediate release propiverine compared to a new extended release dosage form at steady state in healthy subjects (Poster)
70. Rosskopf et al., 8th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, August 29th - 1 September 2007, Amsterdam, The Netherlands: Association between common polymorphisms in the SLCO1B1 gene and the cholesterol-lowering effect of statins in a population based survey (Vortrag)
71. Oswald et al, American Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics - Annual Meeting, March 21-24 2007, Anaheim, USA: Disposition but not sterol-lowering effect of ezetimibe is influenced by polymorphisms of the hepatic uptake transporter OATP1B1 (Poster)

Zeitschriftenbeiträge

1. Koenen A, Köck K, Keiser M, Siegmund W, Kroemer HK, Grube M. Eur J Pharm Sci. 2012, 47(4):774-780. Steroid hormones specifically modify the activity of organic anion transporting polypeptides.
2. Engel A, Oswald S, Siegmund W, Keiser M., Mol Pharm. 2012, 9(9):2577-81. Pharmaceutical excipients influence the function of human uptake transporting proteins.
3. Nassif et al., Radiology 2012, 264(3):741-50. Visualization of hepatic uptake transporter function in healthy subjects using Gd-EOB-DTPA enhanced magnetic resonance imaging.
4. Meyer zu Schwabedissen et al., Clin Pharmacol Ther 2012, 92(1):103-11. Compartment specific gene regulation of the CA-inducer efavirenz *in vivo*.
5. Haznar-Garbacz et al., Eur J Pharm Biopharm. 2012 Mar 8. [Epub ahead of print], A novel liquefied gas based oral controlled release drug delivery system for liquid drug formulations
6. Jia et al., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2012, 891-892:20-6. A LC-MS/MS method to evaluate the hepatic uptake of the liver-specific magnetic resonance imaging contrast agent gadoxetate (Gd-EOB-DTPA) in vitro and in humans.
7. Salje et al., Basic Clin Pharmacol Toxicol 2012, 111(2):99-105. Effects of rifampicin, dexamethasone, St. John's Wort and thyroxine on maternal and fetal expression of Abcb1 and organ distribution of talinolol in pregnant rats.
8. Oswald et al., Clin Pharmacol Ther 2012, 91(3):506-13. Impact of efavirenz on intestinal metabolism and transport: Insights from an interaction study with ezetimibe in healthy volunteers.
9. Peters et al. Drug Metab Dispos 2012, 40(3):522-8. Clarithromycin is absorbed by an intestinal uptake mechanism that is sensitive to major inhibition by rifampicin: results of a short-term drug interaction study in foals.
10. Haznar-Garbacz et al., AAPS PharmSciTech. 2011, 12(4):1183-5. An oral-controlled release drug delivery system for liquid and semisolid drug formulations.

11. Oswald et al., Development of Therapeutic Agents Handbook 2011, 723-42. Ezetimibe and Cholesterol Absorption.
12. Oswald et al., J Pharm Biomed Anal 2011, 56(5):1079-84. Quantitative determination of methylnaltrexone in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
13. Mähler et al., Pharmacogenet Genomics 2011 (accepted). Kidney-specific deletion of multidrug resistance-related protein 2 does not aggravate acute cyclosporine A nephrotoxicity in rats.
14. Block et al., Nano Lett 2011, 11(9):3587-3592. Direct Visualization and Identification of Biofunctionalized Nanoparticles using a Magnetic Atomic Force Microscope.
15. Peters et al., Drug Metab Dispos 2011, 39(9):1643-9. Oral absorption of clarithromycin is nearly abolished by chronic comedication of rifampicin in foals.
16. König et al., Drug Metab Dispos 2011, 39(6):1097-102. Role of anion-transporting polypeptides for cellular mesalzine (5-amino salicylic acid) uptake.
17. Budde et al., J Pharm Sci 2011, 100(9):3951-8. Acute exposure to doxorubicin results in increased cardiac P-glycoprotein expression.
18. Oswald et al., J Pharm Biomed Anal 2011, 55(1):194-201. LC-MS/MS method for the simultaneous determination of clarithromycin, rifampicin and their main metabolites in horse plasma, epithelial lining fluid and broncho-alveolar cells.
19. Oswald et al., Clin Pharmacol Ther 2011, 89(4):524-8. Drug interactions between the immunosuppressant tacrolimus and the cholesterol-absorption inhibitor ezetimibe in healthy volunteers.
20. Oswald et al., Handb Exp Pharmacol 2011, 201:403-47. *In Vivo* Probes of Drug Transport: Commonly Used Probe Drugs to Assess Function of Intestinal P-glycoprotein (ABCB1) in Humans.
21. Nambaru et al., Drug Metab Dispos 2010, 39(1):132-9. Drug efflux transporter MRP5 affects sensitivity of pancreatic cancer cell lines to the nucleoside anticancer drug 5-fluorouracil.
22. Mandery et al., Biochem Pharmacol 2010, 80(11):1746-53. Influence of the flavonoids apigenin, kaempferol, and quercetin on the function of organic anion transporting polypeptides 1A2 and 2B1.
23. Garbacz et al., Expert Opin Drug Deliv 2010, 7(11):1251-61. A biorelevant dissolution stress test device - background and experiences.
24. Hanke et al., Eur J Pharm Biopharm 2010 Oct;76(2):260-8. Commonly used nonionic surfactants interact differently with the human efflux transporters ABCB1 (p-glycoprotein) and ABCC2 (MRP2).
25. Niessen et al., Pharmacogenet Genomics. 2010, 20(6):396-400. Expression of ABC-type transport proteins in human platelets.
26. Leonhardt et al., Drug Metab Dispos 2010, 38(7):1024-8. Hepatic uptake of the magnetic resonance imaging contrast agent Gd-EOB-DTPA, role of human organic anion transporters.
27. Oswald et al., Clin Pharmacol Ther 2010, 87(6):663-7. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions Between the Immunosuppressant Sirolimus and the Lipid-Lowering Drug Ezetimibe in Healthy Volunteers.
28. Venner, Peters et al., Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2010, 381(2):161-9. Concentration of the macrolide antibiotic tulathromycin in broncho-alveolar cells is influenced by comedication of rifampicin in foals.
29. Oswald et al., J Pharm Sci 2010, 99(1):422-9. Synergistic influence of Abcb1 and Abcc2 on disposition and sterol-lowering effects of ezetimibe in rats.
30. Garbacz et al., Drug Dev Ind Pharm. 2010, 36(5):518-30. Investigation of dissolution behavior of diclofenac sodium extended release formulations under standard and biorelevant test conditions.
31. Garbacz et al., Eur J Pharm Sci 2009, 38(2):147-55. Compasison of dissolution profiles obtained from nifedipine extended release once a day products using different dissolution test apparatuses.
32. Garbacz, Adam et al., Deutsche Apotheker Zeitung 2009, 149(27):70-77. Nifedipin-Retardtabletten mit unterschiedlicher Galenik
33. Niessen et al., Drug Metab Dispos 2009, 37(5):1129-37. Human platelets express OATP2B1, an uptake transporter for atorvastatin.
34. Garbacz et al., Eur J Pharm Biopharm 2008, 70(2):421-8. Irregular Absorption Profiles Observed From Diclofenac Extended Release Tablets Can Be Predicted Using A Dissolution Test Apparatus That Mimics *In Vivo* Physical Stresses.
35. Oswald et al., Pharmacogenetics and Genomics 2008, 18(7):559-68. Disposition of ezetimibe is influenced by polymorphisms of the hepatic uptake carrier OATP1B1.

36. Döring et al., Nature Genetics 2008, 40(4):430-6. SLC2A9 influences uric acid concentrations with pronounced sex-specific effects

InnoProfile-Diplom- / Promotionsarbeiten

1. A. Engel, 2007, Diplomarbeit „Entwicklung und Validierung einer LC-MS/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von Tacrolimus und Sirolimus in menschlichen Körperflüssigkeiten“
2. K. Thom, 2007, Diplomarbeit „Steruerung der Arzneistofffreisetzung duch Kohlendioxid-entwickelnde Systeme“
3. T. Hellmann, 2007, Diplomarbeit „Freisetzung von Pentoxifyllin-Retardtabletten unter Standrard-Stresstestbedingungen“
4. M. Schmidt, 2007, medizinische Doktorarbeit „Regulation von Expression und Funktion der Transporterproteine Mdr1 und Mrp2 in exkretorischen Organen bei experimentell induzierter Sepsis“
5. A. Zibell, 2007-2008, Diplomarbeit „Entwicklung und Validierung einer analytischen Methode zur Messung von 1-Methyl-4-phenyl-pyridinium in Plazentaperfusionsstudien“
6. K. Neumann, 2008, Diplomarbeit „Expression und Funktion des organischen Kationentransporters OCT3 in der humanen Plazenta“
7. S. Piller, 2008, Diplomarbeit „In vitro-Untersuchungen zur Beeinflussung hepatischer Aufnahmetransporter durch verschiedene MRT-Kontrastmittel“
8. D. Schönherr, 2008, Diplomarbeit „Untersuchungen zur pH-abhängigen Löslichkeit des Antimykotikums Itraconazol“
9. C. Dill, 2008, Diplomarbeit „Zellbasierte in vitro Modelle zur Beurteilung der hepatischen Aufnahme von Arzneistoffen“
10. U. Adam, 2008, naturwissenschaftliche Promotion „In vitro-Untersuchungen zur Interaktion pharmazeutisch relevanter Tenside mit den humanen Effluxtransportern P-Glycoprotein und MRP2“
11. Christian Rimmbach, 2008, naturwissenschaftliche Promotion „Untersuchungen zur Funktion von Isoformen pharmakologisch relevanter Signalproteine durch RNA Interferenz“
12. L. Wilde, 2008-2009, Diplomarbeit „In vitro-Untersuchungen zur Beeinflussung hepatischer Transportproteine durch ausgewählte MRT-und Röntgenkontrastmittel“
13. A. Below, 2008-2009, Diplomarbeit „Erzeugung superparamagnetischer Aerosole zur Anwendung beim Magnetischen Drug Targeting“
14. C. Wenigmann, 2008-2009, Diplomarbeit „Entwicklung einer pulsatil freisetzenden Minitablette unter Ausnutzung des aktiven Gärprozesses durch Saccharomyces cerevisiae“
15. G. Koopmann, 2008-2009, Diplomarbeit „Untersuchung der zellulären Aufnahme von Primovist über hepatische Influxtransporter“
16. K. Haase, 2008-2009, Diplomarbeit „Populationsgenetik der Arzneimitteltransporter OATPC, OATP8 und MRP2“
17. J. Freyer, 2008-2009, Diplomarbeit „Beeinflussung der Genexpression von ABCB1 und ABCC2 durch Rifampicin in bronchoalveolären Zellen und Bronchialbioptaten von Fohlen“
18. W. Block, 2009, tiermedizinische Promotion, „Pharmakokinetik von Clarithromycin nach der Monotherapie mit Clarithromycin und nach der kombinierten Gabe von Clarithromycin mit Rifampicin beim Fohlen“ (Tierärztliche Hochschule Hannover)
19. S. Schlensak, 2008-2009, Diplomarbeit „Entwicklung und Validierung einer HPLC-Methode zur Quantifizierung von Doxorubicin in murinen Geweben und Kardiomyozyten“
20. A. Peter, 2009, Diplomarbeit „Charakterisierung der analytischen Qualitätsparameter der Proteinquantifizierung mittels Western Blot“
24. S. Venske, 2009, Diplomarbeit „Entwicklung einer aktiven Hefeformulierung zur pulsatilen Freisetzung unter besonderer Berücksichtigung der langfristigen Aufrechterhaltung der Gäraktivität“
25. J. Scherzberg, 2009, Diplomarbeit „Untersuchung des Einflusses der Tröpfchengröße und Partikelgröße von superparamagnetischen Aerosolen auf die Abscheidung im Magnetfeld“
26. S. Iber, 2009, Diplomarbeit „Untersuchungen zur Applikation ausgewählter Präparate über Ernährungssonden“
27. R. Hamp, 2009, Diplomarbeit „Einfluss hepatischer Uptake-Transporter und seiner Varianten auf die Aufnahme des Leberkontrastmittels Primovist“
28. R. Hering, 2010, Diplomarbeit „Entwicklung einer auf Quellung basierenden gastroretentiven Retardformulierung für Furosemid“
29. A. Hubeny, 2010, Diplomarbeit „"Etablierung eines Vesikelassays zur Charakterisierung der Effluxtransporter P-gp und MRP2"

30. K. Didrigkeit, 2010, Diplomarbeit „Zur Bedeutung von OATP1A2 für die zelluläre Aufnahme von Talinolol“
31. M. Wentzlaff, 2010, Diplomarbeit „Das Verhalten superparamagnetischer Aerosole im Magnetfeld bei unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten“
32. K. Schunke, 2010, Diplomarbeit „Entwicklung einer drucksensitiven, monolithischen Arzneiform“
33. K. Semper, 2010, Diplomarbeit „Mit Adsorbentien modifizierte Alginathydrogele für die Gefäß-simulierende Durchflusszelle“
34. M. Schmied, 2010, Diplomarbeit „Metamizolformulierungen mit pulsatilem Freisetzungsverhalten“
35. K. Kriemann, 2010, Diplomarbeit „Charakterisierung der Affinität von Ezetimib und Ezetimib-Glukuronid zu zellulären Uptake- und Effluxtransportern“
36. A. Schumann, 2010, Diplomarbeit „Untersuchung der Affinität von Talinolol zu Transportern der OCT-, OATP- und ABC-Transporter Familie“
37. A. Waldner, 2010, Diplomarbeit „Optimierung der Bionas Sensochip-Technologie zur Charakterisierung des P-gp-vermittelten metabolischen Status von Zellen“
38. C. Gröer, 2010, Diplomarbeit „ Etablierung eines Protokolls zur Untersuchung des intra- und extrazellulären Metaboloms humaner Zelllinien “
39. D. Hintze, 2010, Diplomarbeit „Entwicklung und Optimierung der LC-MS/MS-basierten Quantifizierung von Proteinen“
40. R. Franke, 2010, Diplomarbeit „Entwicklung und Validierung einer LC-MS/MS Methode zur Bestimmung von Tryptophan und ausgewählten Metaboliten in Serum und Organhomogenaten von Schweinen“
41. A. Sauer, 2010, Diplomarbeit „Untersuchungen zur Funktion primärer menschlicher und tierischer Hepatozyten sowie zur Induktion und Modulation durch Arzneistoffe“
42. T. Graf, 2010, Diplomarbeit „Charakterisierung der Affinität von Trospiumchlorid zu zellulären Uptake- und Effluxtransportern“
43. M. Bock, 2011, Diplomarbeit „Neuartige Arzneiformen für das Dünndarm-Targeting“
44. R. Lukas, 2011, Diplomarbeit „Optimierung einer gastroretentiven Retardformulierung am Beispiel des Schleifendiuretikums Furosemid“
45. M. Pötsch, 2011, Diplomarbeit „Wirkstofffreisetzung von Ranolazin 500 mg Retardtabletten (Ranexa®) unter Standard- und Stressbedingungen“ (in Kooperation mit Physiolution)
46. R. Schwandt, 2011, Diplomarbeit, „Untersuchung zur zellulären Aufnahme von Valsartan durch Arzneimitteltransporter“
47. J. Radebold, 2011, Diplomarbeit, „Entwicklung einer Standardmethodik für die Durchführung von Aufnahmeassays zur Charakteristik von frischen humanen und tierischen Hepatozyten“
48. Z. Laghmani, 2011, Diplomarbeit, „Entwicklung und Validierung einer LC-MS/MS Methode zur Bestimmung von Dapson und ausgewählten Metaboliten in Serum, Urin, Stuhl und Leukozyten“
49. K. Eggers, 2011, tiermedizinische Promotion „Clarithromycin und Rifampicin - Distribution und pulmonale Penetration nach kurzzeitiger Gabe beim Fohlen“ (Tierärztliche Hochschule Hannover)
50. S. Reuther 2011, naturwissenschaftliche Promotion „Expression, Lokalisation und Funktion von Transportproteinen in der humanen Plazenta“
51. J. Penski, 2011, naturwissenschaftliche Promotion „Zur Bedeutung von Arzneistofftransportern für die Therapie pulmonaler Infektionen mit Makrolidantibiotika und Rifampicin bei Fohlen“
52. T. Budde, naturwissenschaftliche Promotion (kurz vor Einreichung) „Untersuchungen zur kardialen Expression, Regulation und Funktion von Abca1/g1“
53. A. Engel, naturwissenschaftliche Promotion (kurz vor Einreichung) „Untersuchungen zum Einfluss von Hilfsstoffen auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen unter besonderer Berücksichtigung von Aufnahmetransportern“

Anlagen

Veranstaltungsflyer zum Transporter-Workshop 2008 in Schlemmin

Meeting Venue

Park-Hotel Schloss Schlemmin
18320 Schlemmin

Our meeting will be held at the historic castle of Schlemmin which was built from 1846-50 by Eduard Knoblauch on behalf of Wilhelm Ulrich von Tuhn. The meeting place is located about 60 km east of the 758-year-old Hanseatic city and university town Greifswald.

Organizing Secretariat

Stefan Oswald

Department of Pharmacology
Friedrich-Loeffler-Str. 23d
D-17487 Greifswald

Phone: + 49 3834 865642
Fax: + 49 3834 865631
Email: stefan.oswald@uni-greifswald.de

Arrival and Accommodation

If you are interested to join our meeting, please contact us until September 15.

Greifswald is reachable by car (A20), train or airplane (via Berlin). There will be a shuttle service to bring you from Greifswald to Schlemmin and back.

As our meeting will start early on September 30, it is suggested to arrive the night before. We will arrange Hotel rooms for this night. All meeting participants will stay for one night in Schlemmin Castle before being transferred back to Greifswald main station next morning.

Sponsors

Bayer Schering Pharma AG
MSD Sharp & Dohme GmbH
Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)

ERNST MORITZ ARNDT
UNIVERSITÄT GREIFSWALD

Wissen lockt Seit 1456

"*In vitro* models in transporter research: possibilities and limitations"

Schlemmin, September 30 – October 1, 2008

C_DAT
Center of Drug Absorption and Transport

INNOPROFILE
UNTERNEHMEN REGION
Die BMBF-Innovationsinitiative Neue Länder

Dear Colleagues,

On behalf of the Meeting Organizing Committee, it is my pleasure to invite you to attend our upcoming scientific meeting entitled *"In vitro models in transporter research: possibilities and limitations"*. The meeting will be held in Schlemmin close to Greifswald, Germany from September 30 to October 1, 2008.

We hope that this meeting will provide a great opportunity to exchange ideas and expertise as well as the opportunity to develop cooperation in the field of transporter protein research.

We are looking forward to welcome you to Greifswald.

Sincerely,
Stefan Oswald

Meeting Organizing Committee

Werner Siegmund
Heyo K. Kroemer
Werner Weitschies
Dieter Rosskopf

Program

Monday, September 29, 2008

Opening Reception

19.00 – 22.00 h

Historic harbor of Greifswald
Hafenstr. 31
(at the old brick tower)

From the historic harbor we will start a boat trip on the river Ryck to the Greifswalder Bodden, a shallow bay of the Baltic Sea.

Tuesday, September 30, 2008

Shuttle service going from Greifswald to Schlemmin starting from the Institute of Pharmacology at 8.00 h

Morning Course

Applications of Cellular Models

09.30 – 11.00 h

Jörg König

Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, University of Erlangen-Nürnberg, Germany

Single- and multi-transfected cell lines as model systems for the analysis of uptake and vectorial transport

Hermann Koepsell

Institute of Anatomy and Cell Biology, University of Würzburg, Germany

Mechanisms of organic cation and organic anion transporters of the SLC22 family and effects of mutations

11.00 – 11.30 h Coffee Break

11.30 – 13.00 h

Bruno Stieger

Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Hospital of Zürich, Switzerland

Role of organic anion (bile salt) transporters in acquired cholestasis

Peter Krajcsi

Solvo Biotechnology, Budaörs, Hungary

***In vitro* methods to characterize drug-transporter interactions - An industrial perspective**

13.00 – 14.30 h Lunch

Afternoon Course

Implications and Characterization

14.30 – 16.00 h

Per Artursson

Department of Pharmacy, University of Uppsala, Sweden

***In vitro–in vivo* correlations of transporter models**

Amin Rostami

Academic Unit of Clinical Pharmacology, University of Sheffield, UK

***In silico* prediction of drug metabolism and transport**

16.00 – 16.30 h Coffee Break

16.30 – 18.00 h

Patrizia Ghiotti,

GlaxoSmithKline, Verona, Italy

Characterization of *in vitro* drug liberation

Jacek Wisniewski

Max-Planck-Institute for Biochemistry, Martinsried, Germany

Mass spectrometry-based characterization of membrane proteins

Wednesday, October 1, 2008

Shuttle service going from Schlemmin to Greifswald main station at 09.00 h

First Status Seminar of the InnoProfile Initiative "*Drug-Delivery-Technologies*"

Young Researchers Meeting of the Institute of Pharmacology, University of Greifswald, Germany

Veranstaltungsflyer zum *Drug Delivery*-Workshop 2010 in Greifswald

Partners

CORTRONIK

RIEMSER

Institut für Diabetes "Gerhardt Katsch" Karlsburg

PRIMACYT Cell Culture Technology

PS-Pferdehaltung GmbH

Bionas®

LTS Lohmann Therapie-Systeme

baltic analytics

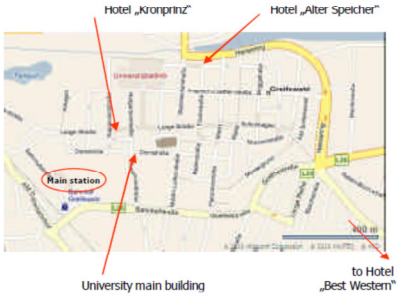
Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald

Meeting Venue

Main building of the University of Greifswald
Domstraße 11
Conference hall
Entrance 2
17487 Greifswald

Organisation and conference office

Gunnar Glöckl
Institute of Pharmacy
Friedrich-Ludwig-Jahn-Str. 17
D-17487 Greifswald
Phone: + 49 3834 864809
Fax: + 49 3834 864886
Email: gunnar.gloeckl@uni-greifswald.de



C_DAT Center of Drug Absorption and Transport

INNOPROFILE UNTERNEHMEN REGION

Workshop of the Greifswald InnoProfile project:

Drug Delivery Technologies to optimize the clinical application of drugs

July 1-2, 2010

Dear colleagues,

it is our pleasure to announce the upcoming 2nd scientific meeting organised by the Greifswald InnoProfile project. The workshop entitled "Drug Delivery Technologies to optimize the clinical application of drugs" will be held in Greifswald, Germany, in the conference hall of the historic university main building from July 1st to 2nd, 2010.

We hope that this meeting will provide a great chance to exchange ideas and expertise as well as the opportunity to develop co-operations in the field of innovative drug delivery research.

We are looking forward to welcoming you in Greifswald.

Sincerely,

Gunnar Glöckl
Ulrike Hanke
Werner Weitschies

Program

Thursday, July 1st

14:30-15:00	Get together
15:00-15:10	Welcome and introduction to the InnoProfile project Gunnar Glöckl, Greifswald

Session I
VARIATION OF DRUG PLASMA PROFILES AFTER ORAL ADMINISTRATION:
THE RATIONALE FOR DISSOLUTION TESTING

15:10-15:50	*Invited lecture* "High-Tech" dosage forms and variability - Is it worth the trouble? Henning Blume, Oberursel
15:50-16:30	*Invited lecture* "The ideal levodopa" - Pharmacokinetic and metabolic considerations Thomas Müller, Berlin
16:30-16:50	The complexity of intestinal drug absorption: experiences with ezetimibe and talinolol Stefan Oswald, Greifswald
16:50-17:20	*Coffee break*

Session II
ASPECTS INFLUENCING ABSORPTION OF ORALLY ADMINISTERED DRUGS

17:20-18:00	*Invited lecture* Impact of gut transit on the oral absorption of drugs Clive G. Wilson, Glasgow
18:00-18:40	*Invited lecture* Intestinal precipitation of drugs as a factor potentially limiting oral absorption of low solubility drugs Bertil Abrahamsson, Mölndal
18:40-19:00	Intestinal transporter systems limiting drug absorption Markus Grube, Greifswald
19:30-???	*Dinner in the restaurant "Tischlerei"*

Friday, July 2nd

Session III
INNOVATIVE DRUG DELIVERY APPROACHES

9:30-10:10	*Invited lecture* Erosion Based Oral Drug Delivery Daniel Bar-Shalom, Copenhagen
10:10-10:30	Development of a gastro-retentive ER formulation of furosemide Gunnar Glöckl, Greifswald
10:30-11:00	*Coffee break*

Session IV
DISSOLUTION TESTING FOR QUALITY CONTROL AND DRUG DEVELOPMENT – A CONTRADICTION?

11:00-11:40	*Invited lecture* About the predictivity of pharmacopoeial dissolution methods Sandra Klein, Greifswald
11:40-12:00	About a modified dissolution test apparatus that mimics mechanical stress on solid dosage forms Grzegorz Garbacz, Greifswald
12:00-12:15	Closing

Veranstaltungsflyer zum C_DAT-Eröffnungssymposium 2011 in Greifswald

Registration

Name:

First name:

Institution:

Street:

Postal Code, City

Email:

Telephone:

Telefax:

Registration deadline: 30.07.2011

Symposium Venue:

Ernst Moritz Arndt University
Center of Drug Absorption and Transport
Felix-Hausdorff-Street
D-17487 Greifswald

Organizing Secretariat

Ivette Fronczek
Dana Jakubpreiksch-Opel

Department of Pharmacology
Friedrich Loefflerstr. 23 d
D-17487 Greifswald

Telefon: +49 3834 865632
Fax: +49 3834 865631
Email: pharmako@uni-greifswald.de

Accommodation

Please contact: Greifswald-Stadtinformation
Telefon: +49 3834 521380
Email: greifswald-information@t-online.de

First Announcement

Center of Drug Absorption and Transport (C_DAT)

From concepts to patients

A symposium on behalf of the opening of the new research building

Organized by

Sandra Klein
Heyo K. Kroemer
Bernhard Rauch
Thomas Schweder
Werner Siegmund
Werner Weitschies

Greifswald, November 24/25, 2011

PROGRAM

Thursday, November 24, 2011

14.00 – 15.45 h

Rational drug delivery design: From in vitro dissolution to in vivo performance

P. Augustijns, Leuven
Evaluation of drug delivery systems: In vitro and in models

Sandra Klein, Greifswald
Simulating gastrointestinal passage: An essential step towards biorelevant dissolution testing

Gregor Garbacz, Greifswald: Mimicking intestinal physical stresses: An irrelevant factor or a mostly overlooked determinant of the in vivo performance of oral drug delivery systems?

Anne Seidlitz, Greifswald
Dissolution models beyond the gastrointestinal tract: Experiences with biorelevant test systems for drug eluting stents.

Werner Weitschies, Greifswald
In vivo imaging of the performance of drug delivery systems: A key step for understanding drug delivery

16.15 – 18.00 h

Drug transporters along the route to the place of action

Mikko Niemi, Helsinki
Membrane transporters: Major variables in disposition and clinical effects of drugs

Stefan Oswald, Greifswald
The intestinal transporter barrier: A challenge to overcome deficits in drug absorption

Ali Nassif, Greifswald
Visualization of hepatic drug uptake using contrast-enhancing MRI

Jette Peters, Greifswald
Drug distribution in broncho-alveolar secretions and cells: Role of pulmonary drug transporters

Werner Siegmund, Greifswald
To evaluate the clinical impact of drug transporters: An interdisciplinary methodological approach.

20.00 – open end

Get together

Friday, November 25, 2011

09.00 – 09.45 h

Technology platforms

Roland Wagner, Laupheim
Flexible Solutions for Therapeutic Protein Manufacturing

Thomas Schweder, Greifswald
The proteomics platform: From proteins to function

10.00 – 12.00 h

The bridge between drug transport and personalized medicine

Dan M. Roden, Vanderbilt, Nashville
From pharmacogenomics to personalized medicine – future drug therapy

Gabriele Jedlitschky, Greifswald
Drug transport in microcompartments: Lessons from platelets

Markus Grube, Greifswald
From OATPs and OCTNs: The role of uptake transport at the border of physiology and pharmacology

Henriette Meyer zu Schwabedissen, Greifswald
PXR and beyond: Central switches for drug transport and diseases

Heyo K. Kroemer, Greifswald
At the borderline of pharmacology and pharmacy: The role of the Center of Drug Absorption and Transport (C_DAT) in a rapidly changing environment