

# »In vitro-in vivo« korelacija (IVIVC) za učinkovine v pripravkih s podaljšanim sproščanjem, ki se intenzivno metabolizirajo ali absorbirajo s prenašalci v prebavilih

## In vitro in vivo correlation (IVIVC) for drugs in extended release formulations which are extensively metabolized or absorbed with transporters

Uroš Klančar, Igor Legen, Albin Kristl, Aleš Mrhar

**Povzetek:** Na sproščanje učinkovin iz pripravkov s podaljšanim sproščanjem in absorpcijo iz prebavil vplivajo fizikalno kemijske lastnosti učinkovine, lastnosti farmacevtske oblike in fiziološke lastnosti gastrointestinalnega trakta (GIT). Nekatere učinkovine se v prebavilih lahko intenzivno metabolizirajo, ali pa na njih vplivajo različni prenašalci. Oboje lahko znatno spremeni obseg absorpcije in posledično stopnjo »in vitro-in vivo« korelacije (IVIVC), ki predstavlja osnovo za napovedovanje plazemskih koncentracijskih profilov učinkovine na osnovi »in vitro« preskusov raztapljanja. V članku so glede na vrsto učinkovin, ki imajo različne lastnosti glede na biofarmaceutski sistem klasifikacije (BCS) in so vgrajene v pripravke s podaljšanim sproščanjem, opisani primeri vplivov metaboličnih procesov in prenašalcev na uspešnost doseganja IVIVC.

**Ključne besede:** IVIVC, metabolizem, prenašalci, podaljšano sproščanje

**Abstract:** Physical-chemical characteristics of a drug, formulation properties and physiology of gastrointestinal (GI) tract have an influence on drug release from extended release formulations and consequent absorption. Absorption of various drugs is influenced by metabolism and different transporters which can lead to changes in the extent of absorption and difficulties in establishing *in vitro in vivo* correlation (IVIVC). IVIVC models are prerequisite to predict *in vivo* plasma concentration profiles on basis of *in vitro* data. In this article various examples of metabolism and transporter influences on IVIVC for different drugs (according to biopharmaceutical classification system - BCS) incorporated in extended release formulations are theoretically discussed.

**Keywords:** IVIVC, metabolism, transporters, extended release

## 1 Uvod

Ključna lastnost pripravkov, v večini primerov tablet, s podaljšanim sproščanjem je v tem, da sprostijo učinkovino po vnaprej določenem profilu, ki ga pridobimo s pomočjo »in vitro« testiranj in izvedbe »in vivo« študij na ljudeh. V idealnem primeru je »in vitro« profil sproščanja enak kot ga pričakujemo »in vivo« in takrat lahko rečemo, da obstaja dobra IVIVC. Doseganje dobre IVIVC, zlasti za pripravke s podaljšanim sproščanjem, je trenutno eden najbolj aktualnih ciljev tako proizvajalcev originatorskih zdravil kot tudi generične farmacevtske industrije. Z razvojem IVIVC želimo zmanjšati obseg farmakokinetičnih testiranj tekom razvoja originatorskega zdravila, pri generičnih zdravilih pa povečati uspešnost bioekvivalenčnih študij, kar je glavni pogoj za registracijo zdravila. V obeh primerih se zmanjšajo stroški in število potrebnih študij na ljudeh. Dobra IVIVC olajša tudi registracijo drugih jakosti zdravil preko koncepta opustitve bioekvivalenčne študije (biowaiver – koncept, ki omogoča registracijo generičnega zdravila samo z izvedbo *in vitro* preskusov), omogoča postavitev biološko

relevantne specifikacije in vključevanje raznih sprememb v proizvodnem postopku, sestavi ter lokaciji proizvodnje potem ko je bilo zdravilo že registrirano (1,2).

Da bi dosegli dobro IVIVC, moramo za test sproščanja uporabiti ustrezno »in vitro« metodo, ki dobro ponazarja pogoje v GIT. Na sproščanje učinkovin iz farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem lahko vplivajo pH, ionska moč, površinsko aktivne snovi, etanol in druge komponente v mediju za raztapljanje (3-6). Predvsem na ogrodne tablete, bolj kot na katere druge farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem, vplivajo različni hidrodinamski vplivi, motorična aktivnost želodca - MMC (mioelektrični migrirajoči kompleks) in druge fizikalne obremenitve v GIT, v stanju na tešče (angl. fasted) ali po obroku (angl. fed), kar je pomembno pri načrtovanju bioekvivalenčnih študij (7, 8, 9). Pomembno je tudi, da se učinkovina iz pripravkov s podaljšanim sproščanjem sprosti v času znotraj absorpcijskega okna. Tableta se v tankem črevesju zadržuje od 3 do 4 ure, v debelem pa približno 22 ur.

Poleg dejavnikov, ki vplivajo na sproščanje učinkovine iz pripravka, na farmakokinetiko vpliva tudi mehanizem ter kinetika absorpcije in (predsystemskega) metabolizma učinkovine, potem ko je ta že raztopljena v prebavilih. Prehod skozi enterocite v črevesni steni lahko poteka na različne načine kot so pasivna difuzija, endocitoza in s prenašalci. Na absorpcijo lahko vpliva tudi limfni obtok, ki ga stimulira prisotnost maščob v hrani (10). Prenášalci na enterocitih lahko tudi zmanjšajo ali povečajo obseg absorpcije določenih učinkovin in tako vplivajo na biološko uporabnost. Poznavanje vseh naštetih dejavnikov je pomembno pri ugotavljanju IVIVC.

## 2 Uporaba BCS klasifikacije pri pripravkih s podaljšanim sproščanjem

### 2.1 Osnove biofarmacevtskega sistema klasifikacije (BCS)

Biofarmacevtski sistem klasifikacije (angl. Biopharmaceutical Classification System, BCS) predstavlja osnovni okvir za ocenjevanje in doseganje IVIVC. Od pojava koncepta BCS leta 1995 je njegov glavni namen razdeliti učinkovine v 4 razrede glede na topnost učinkovine in permeabilnost skozi membrano stene GIT (Slika 1 in 2) (11). Glede na to, v kateri razred učinkovina spada, lahko napovemo uspešnost IVIVC. Uporabnost BCS klasifikacije se je do danes razširila, saj predstavlja smernico pri iskanju novih učinkovin, pri predkliničnem in kliničnem razvoju zdravil, pri načrtovanju in razvoju različnih generičnih zdravil in kot orodje za zmanjšanje števila bioekvivalenčnih študij (11, 12).

<p><b>Razred I</b> dobra topnost dobra permeabilnost <i>dobra IVIVC</i></p>	<p><b>Razred II</b> slaba topnost dobra permeabilnost <i>dobra IVIVC</i></p>
<p><b>Razred III</b> dobra topnost slaba permeabilnost <i>omejena IVIVC</i></p>	<p><b>Razred IV</b> slaba topnost slaba permeabilnost <i>omejena IVIVC</i></p>

**Slika 1:** BCS razdeli učinkovine na štiri razrede. Dobra permeabilnost pomeni, da se po peroralni aplikaciji absorbira več kot 90 % odmerka; dobra topnost pomeni, da se v 250 ml vodnega medija raztopi najvišji odmerek zdravila v pH območju 1-7,5.

**Figure 1:** According to BCS there are four classes of drugs. Good permeability is when more than 90% of dose is absorbed after oral application. Good solubility means that the highest dose of drug is dissolved in 250 ml of aqueous media within pH range 1-7,5.

<p><b>Razred I</b> <i>amilorid, amitriptilin, antipirin, atropin, buspiron, ciklofosfamid, diazepam, difenhidramin, diltiazem, doksepin, efedrin, enalapril, estradiol, etambutol, etinil fenilalanin, fenobarbital, fluoksetin, imipramin, kaptopril, ketoprofen, kinidin, klorfeniramin, klorokinon, kofein, levodopa, levofloksacin, lidokain, meperidin, metoprolol, metronidazol, midazolam, misoprostol, prednizolon, primakin, promazin, propranolol, rosiglitazon, salicilna kislina, teofilin, valprojska kislina, verapamil, zidovudin</i></p>	<p><b>Razred II</b> <i>amjodaron, atorvastatin, azitromicin, ciklosporin, ciprofloksacin, cisaprid, danazol, dapson, difunisal, digoksin, diklofenak, eritromicin, fenitoin, flubiprofen, glipizid, gliburid, griseofulvin, ibuprofen, indinavir, indometacin, itrakonazol, karbamazepin, karvedilol, ketokonazol, klorpromazin, lansoprazol, lovastatin, mebendazol, naproksen, nelfinavir, ofloksacin, oksaprozol, piroksikam, ritonavir, sakvinavir, sirolimus, spironolakton, takrolimus, talinolol, tamoksifen, terfenadin, varfarin</i></p>
<p><b>Razred III</b> <i>amoksisilin, aciklovir, atenolol, bidizomid, bisfosfonati, cefazolin, cetirizin, cimetidin, ciprofloksacin, dikloksacilin, eritromicin, famotidin, feksofenadin, furosemid, ganciklovir, hidroklorotiazid, kaptopril, kloksacilin, lizinopril, metformin, metotreksat, nadolol, penicilini, pravastatin, ranitidin, tetraciklin, trimetoprim, valsartan, zalcitabin</i></p>	<p><b>Razred IV</b> <i>amfotericin B, ciprofloksacin, furosemid, klorotiazid, klortalidon, kolistin, mebendazol, metotreksat, neomicin</i></p>

**Slika 2:** Primeri učinkovin glede na BCS razred. Nekatere učinkovine so v dveh razredih, npr. furosemid (I in IV), kaptopril (I in III), metotreksat (III in IV) ali celo treh, kot je ciprofloksacin (II, III, IV), kar je posledica različnih virov in načina določanja (13, 14).

**Figure 2:** Examples of drugs according to BCS. Some drugs appear in two classes: furosemid (I and IV), captopril (I and III), methotrexat (III and IV) or three: ciprofloxacin (II, III, IV). This is due to different literature data and methods for BCS class determination (13, 14).

### 2.2 BCS in pripravki s podaljšanim sproščanjem

Kljub razširjenosti uporabe BCS klasifikacije je njena uporabnost za ocenjevanje IVIVC pri pripravkih s podaljšanim sproščanjem vprašljiva in predstavlja velik izziv, predvsem zaradi težavnosti simuliranja dejanskih razmer v GIT z »in vitro« testi. Po drugi strani pa na osnovi BCS klasifikacije lahko ocenjujemo, katere učinkovine je smiselno vgrajevati v pripravke s podaljšanim sproščanjem. Dobro topne in dobro permeabilne učinkovine z večjo ali enako permeabilnostjo kot jo ima metoprolol (uporabljen standard za dobro permeabilnost) so najbolj primerne za vgrajevanje v pripravke s podaljšanim sproščanjem

in v tem primeru ponavadi obstaja tudi dobra IVIVC. Učinkovina se iz pripravkov s podaljšanim sproščanjem lahko sprošča tudi do 24 h, zato je ključno, da poznamo njen mehanizem absorpcije vzdolž celotnega GIT. Del učinkovine se bo absorbiral tudi v kolonu in pomembno je, da zagotovimo ustrezno absorpcijo tudi v tem delu črevesja. Nekatere učinkovine se bolje absorbirajo v kolonu kot v tankem črevesju in biološka uporabnost bi bila večja, če bi dosegli sproščanje učinkovine in absorpcijo v tem predelu GIT. Iz slike 3 vidimo, da bi bila biološka uporabnost nifedipina večja, če bi dosegli, da se absorbira bolj v kolonu (intubacija v kolon). Razlog za to je večji metabolizem nifedipina pri prvem prehodu skozi jetra. Za diltiazem in teofilin pa je relativna biološka uporabnost po intubaciji učinkovine v kolon nižja kot po peroralni aplikaciji (11).

Pri učinkovinah s slabo permeabilnostjo, obstaja nevarnost nepopolne absorpcije in večje intra- in interindividualne variabilnosti, saj je ponavadi permeabilnost v kolonu še nižja kot v tankem črevesju. To pomeni, da učinkovine iz BCS razredov III in IV niso dobre kandidatke za pripravke s podaljšanim sproščanjem, pričakujemo pa tudi slabo IVIVC. Pri amoksicilinu na primer, ki spada v BCS III in se absorbira s pomočjo oligopeptidnega prenašalca (PepT1), niso dokazali nikakršne absorpcije v kolonu. V tem primeru je izdelava farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem nesmiselna. Podobno je pri uporabi učinkovin, ki se v kolonu bolj metabolizirajo. Posebej problematične so učinkovine, ki imajo absorpcijsko okno v zgornjem delu tankega črevesja, na primer šibke kisline s slabo permeabilnostjo, ki se slabo absorbirajo v ileumu, kjer je pH višji. Tak primer je atorvastatin, ki je hkrati tudi substrat za P-gp (15). Z novejšimi tehnološkimi pristopi pa je tudi za tovrstne učinkovine možno doseči ustrezno absorpcijo, saj se na primer zaradi določenih lastnosti farmacevtske oblike lahko dalj časa zadržujejo v zgornjem delu GIT (11,12).

V praksi v pripravkih s podaljšanim sproščanjem vseeno prevladujejo učinkovine iz prvih dveh razredov in razvrstitev učinkovin po BCS klasifikaciji pri teh lahko napišemo tudi drugače (Preglednica 1). Avtorji predlagajo razdelitev učinkovin kjer sta razreda III in IV s slabo permeabilnostjo izvzeta, prva dva razreda pa sta dodatno razdeljena glede na to, ali je permeabilnost različna vzdolž GIT ali ne. Dodan je še peti razred, za učinkovine s pH odvisno topnostjo in permeabilnostjo.

**Preglednica 1:** Razširitev BCS klasifikacije za pripravke s podaljšanim sproščanjem (12).

**Table 1:** BCS classification for extended release formulations (12).

Razred	Opis	IVIVC	Primeri
I a	dobra topnost, dobra permeabilnost, ki je enaka vzdolž GIT	Dobra	glipizid, nitroglicerol, paracetamol, teofilin
I b	dobra topnost, permeabilnost, ki je različna vzdolž GIT	Omejena	atropin, celiprolol, levodopa, morfin, verapamil
II a	slaba topnost, dobra permeabilnost, ki je enaka vzdolž GIT	Dobra	ciklosporin, danazol, diklofenak, digoksin, eritromicin, glipizid
II b	slaba topnost, permeabilnost je različna vzdolž GIT	Omejena	fenacetin, indometacin, kloramfenikol, steroidi,
V a	topnost in permeabilnost različni vzdolž GIT, bazične učinkovine	Dobra ali omejena*	felodipin, mesalamin, metoprolol, morfin, nifedipin, omeprazol
V b	topnost in permeabilnost različni vzdolž GIT, kisle učinkovine	Dobra ali omejena*	acetazolamid, amoksicilin, diklofenak, fenitoin, ketoprofen, naproksen

\* za razred Va je IVIVC dobra, če je tableta načrtovana tako, da omogoča od pH neodvisno sproščanje učinkovine, če pa se topnost učinkovine zmanjša zaradi pH okolja, ki je nad njenim pKa, bo korelacija omejena. Za kisle učinkovine (razred Vb) je lahko omejena IVIVC, saj se že v tankem črevesju ionizirajo zaradi česar se jim zmanjša permeabilnost. Lahko pa je tudi pri višjih pH dovolj dobra permeabilnost in IVIVC bo dobra. Tak primer je ketoprofen.



**Slika 3:** Povprečna relativna biološka uporabnost ( $F_{rel}$ ), po aplikaciji različnih dobro permeabilnih učinkovin na različna mesta v GIT s pomočjo intubacije. Na različnih predelih v GIT se absorbira podobna količina učinkovine, relativno glede na absorbirano količino učinkovine vzete po peroralni aplikaciji. Biološka uporabnost učinkovine vzete po peroralni aplikaciji je hipotetično 100 % (11).

**Figure 3:** Mean relative bioavailability ( $F_{rel}$ ) after administration to different sites in the GI tract of different high-permeability drugs to humans by use of intubations. The amount of drug absorbed was similar over the entire GI tract also including the colon relative to absorbed amount after oral administration.

Za vse razrede v Preglednici 1 je možna IVIVC, kar je odvisno od specifičnih lastnosti učinkovine in farmacevtske oblike. Ocena ali gre za dobro (stopnja A) ali omejeno (stopnja C) IVIVC je povzeta iz literarnih podatkov (12).

## 2.3 Biofarmaceutski sistem klasifikacije odstranjevanja učinkovine (BDDCS)

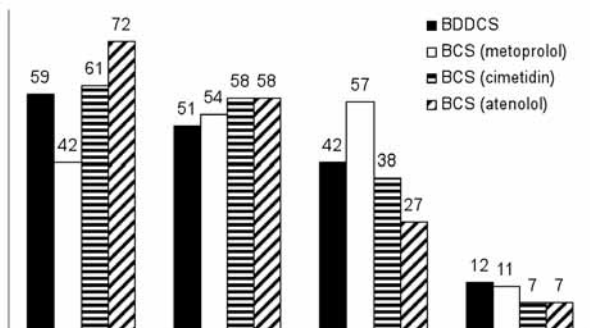
Biofarmaceutski sistem klasifikacije odstranjevanja učinkovine (angl. Biopharmaceutic Drug Disposition Classification System, BDDCS) so uvedli z namenom, da bi bolj poudarili komponento metabolizma in vpliv prenašalcev na obseg absorpcije (Slika 4).

<b>Razred I</b> dobra topnost obsežen metabolizem	<b>Razred II</b> slaba topnost obsežen metabolizem
<b>Razred III</b> dobra topnost nizek metabolizem	<b>Razred IV</b> slaba topnost nizek metabolizem

**Slika 4:** BDDCS klasifikacija razdeli učinkovine na 4 razrede na osnovi topnosti in metabolizma namesto permeabilnosti.

**Figure 4:** BDDCS classification system divides drugs into 4 classes on basis of solubility and metabolism instead of permeability.

Obe predstavljeni klasifikaciji dajeta dokaj primerljivo razvrstitev učinkovin (Slika 5), čeprav temeljita na različnih procesih. BDDCS upošteva encimsko vezavo in prenašalce, BCS pa permeabilnost skozi različne membrane celic. Razlike so odvisne tudi od tega, glede na katero standardno učinkovino, ki je merilo za dobro permeabilnost, je primerjava narejena (13).



**Slika 5:** Primerjava med 164 učinkovinami razvrščenih v razrede BDDCS in BCS-glede na tri standardne učinkovine (metoprolol, cimetidin, atenolol), izbrane kot merilo za dobro permeabilnost (13).

**Figure 5:** Comparison plots of the classification of 164 drugs by BDDCS and by BCS using three different reference high permeability drugs (13).

Za učinkovine iz razredov BCS I in BDDCS I, ki se dajejo v velikem odmerku, bo vpliv prenašalcev in metabolizma na biološko uporabnost manjši, saj se metabolični encimi in prenašalci (izločevalni ali absorptivni) v GIT nasitijo, učinkovina pa je v osnovi dobro permeabilna. V primeru pripravkov s podaljšanim sproščanjem pa bi tudi pri tej skupini učinkovin lahko bil viden vpliv metabolizma in prenašalcev, saj se sprost manjša količina učinkovine v določenem času in encimi ali prenašalci se ne nasitijo. Možno je tudi, da se biološka uporabnost za učinkovine v sistemih s podaljšanim

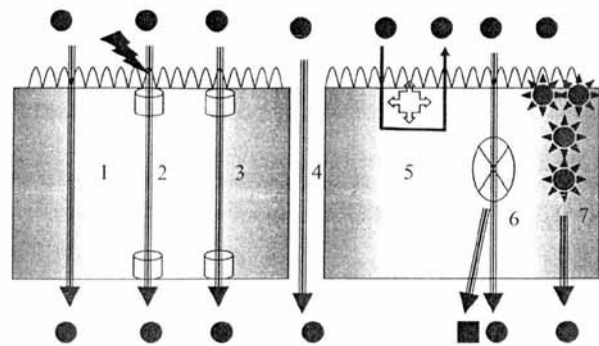
sproščanjem poveča. To se zgodi v primeru, ko se učinkovina intenzivno metabolizira bolj v zgornjem delu GIT. Če se takrat celotna količina učinkovine sprost hitro, se je metabolizira več kot če se sprošča počasi skozi celoten GIT. V splošnem so torej vplivi prenašalcev in metabolizma pogojeni s koncentracijo učinkovine, zato lahko pričakujemo drugačne vplive na učinkovine v pripravkih s podaljšanim sproščanjem glede na pripravke s takojšnjim sproščanjem.

Pri učinkovinah iz razreda II je zaradi slabe topnosti manj učinkovine na voljo za absorpcijo, izločevalni prenašalci se ne nasitijo, kar lahko bistveno zmanjša obseg absorpcije. Še večji vpliv prenašalcev bo na tiste učinkovine iz razreda II, ki se hkrati tudi encimsko razgradijo v steni GIT. Tudi pri učinkovinah iz razredov III in IV so pomembni absorptivni in izločevalni prenašalci (14).

V realnosti tudi BDDCS sistem ne da vseh omenjenih in predvsem dovolj natančnih napovedi za »in vivo« obnašanje učinkovin, saj vsebuje dodatne neznanke metabolizma, katere je potrebno določiti in raziskati. Možno je, da bo BDDCS sistem v prihodnosti omogočal bolj natančno razvrstitev učinkovin, kar bi posredno omogočilo boljše napovedi IVIVC.

## 3 Biofarmaceutske lastnosti učinkovin pomembne pri absorpciji

Absorpcija je kompleksen proces, ki poteka po različnih mehanizmih (Slika 6), ključni pa so topnost in hitrost raztapljanja učinkovine ter metabolizem v lumnu črevesja in permeabilnost skozi enterocite GIT.



**Slika 6:** Različne poti in vplivi na absorpcijo (puščice kažejo smer absorpcije iz lumna skozi enterocit v kri): pasivna-transcelularna (1), aktivna-s pomočjo ATP (2), olajšana difuzija (3), pasivna-paracelularna (4), vpliv izločevalnih prenašalcev (5), vpliv intestinalnega metabolizma in absorpcija metabolitov (6), posredovana z receptorji (7) (16).

**Figure 6:** Different absorption routes and influences (arrows shows direction of absorption from GI lumen through enterocyte into the blood circulation): passive-transcellular (1), active (2), facilitated diffusion (3), passive-paracellular (4), export transporters (5), intestinal metabolism (6), receptor mediated absorption (7) (16).

V proces absorpcije so lahko vpleteni: metabolizem s Citokromi P450 (CYP), absorpcija preko receptorsko posredovane endocitoze, olajšana difuzija, absorpcija s pomočjo prenašalcev in vpliv prenašalcev na interakcije med različnimi učinkovinami ter interakcije učinkovina-hrana. Na obseg absorpcije lahko vplivajo tudi prebavni encimi v lumnu GIT, črevesna mikroflora in snovi, ki vplivajo na permeabilnost črevesne stene (pospeševalci absorpcije). V nadaljevanju sledi podrobnejši pregled vpliva metabolizma s CYP in prenašalcev v črevesni steni na absorpcijo različnih učinkovin (16, 17, 18).

### 3.1 Metabolizem s Citokromi P450

Encimi družine Citokrom P450 (CYP) sodelujejo pri metaboličnih oksidacijah, redukcijah, hidrolizah in konjugacijah številnih učinkovin in so pomembni za učinek prvega prehoda (angl. first pass). Posledica učinka prvega prehoda je lahko zmanjšana biološka uporabnost (kljub dobri absorpciji), nastanek toksičnih metabolitov in aktivacija učinkovine, ki je v obliki predzdravila. Znano je, da se približno 50 % registriranih zdravil bolj ali manj encimsko razgradi z encimi družine CYP. V smislu vpliva na sam proces absorpcije so najbolj odgovorni encimi družine CYP3A4, saj se v veliki meri nahajajo v enterocitih.

#### Citokromi P450 3A4 (CYP3A4)

Encimi te družine so glavni pri metabolizmu različnih učinkovin. Nahajajo se v jetrih, steni GIT in drugih tkivih. Aktivni del encima je molekula hema, ki je vpeta v proteinsko strukturo encima. Od jejunuma do ileuma se količina encima zmanjšuje, v kolonu ga ni, kar pomeni, da ima lahko učinkovina, ki je substrat za CYP3A4, večjo biološko uporabnost, če bi s pripravkom dosegli sproščanje pretežno predvsem v ileumu. Teoretično je absorpcija učinkovine, ki je substrat za CYP3A4, iz tablete s podaljšanim sproščanjem slabša kot v primeru takojšnjega sproščanja. Če se učinkovina takoj sprosti, se CYP3A4 nasiti in delež metabolizirane učinkovine v steni GIT je relativno nizek. Poznamo tudi kompetitivne (vsak substrat je lahko kompetitivni inhibitor drugemu substratu) in nekompetitivne inhibitorje CYP3A4, ki izboljšajo absorpcijo in biološko uporabnost drugih učinkovin. Kot inhibitor CYP3A4 je znan grenivkin sok, ki vsebuje flavonoide in furanokumarine (16-18). Tudi mnoge zdravilne učinkovine so substrati za CYP3A4 (Preglednica 2) in pri vseh teh lahko ob določenih pogojih pride do spremenjene

biološke uporabnosti. Znani so še induktorji CYP3A4, ki lahko preko zvečanja genske ekspresije dodatno povečajo metabolizem učinkovin. Za doseganje uspešne IVIVC v teh primerih je potrebno imeti jasno sliko o vplivu metabolizma v steni črevesja.

### 3.2 Prenášalci

Prenašalni proteini se na splošno nahajajo v različnih organih (GIT, ledvica, jetra, pljuča, možgani, testisi, skeletno mišičje, itd.). Izražanje genov za prenašalne proteine je različno glede na vrsto tkiva in organ v katerem se nahajajo. V prebavilih prenašalni proteini sodelujejo pri procesu absorpcije v smislu olajšane difuzije učinkovin ali pa omogočijo aktiven prenos učinkovin v obeh smereh gastro-intestinalne membrane. Prenašalci lahko torej zmanjšajo ali povečajo obseg absorpcije. Na proces absorpcije neke učinkovine in posledično na biološko uporabnost zdravila lahko vpliva več različnih prenašalcev in drugih substratov. Pri absorpciji gre torej za kompleksen proces. Teoretično je vpliv na učinkovine v pripravkih s podaljšanim sproščanjem večji, saj se prenašalci ne nasitijo tako hitro (glej tudi poglavje 2.3). Izločevalnih prenašalcev je več vrst, fiziološko in evolucijsko gledano so v glavnem povezani s preprečevanjem absorpcije telesu tujih, toksičnih snovi in razvojem rezistence. Po drugi strani je tudi veliko prenašalcev, ki absorpcijo izboljšajo in tako povečajo biološko uporabnost (Slika 7) (20, 21).

#### ATP kasetni prenašalci

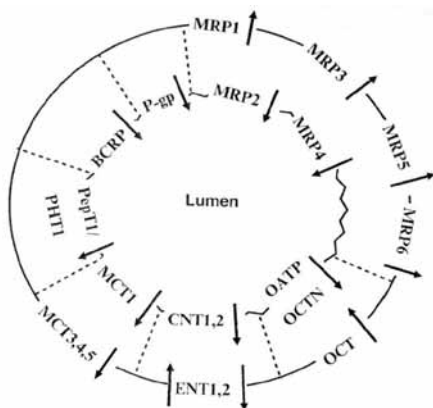
ATP kasetni prenašalci (angl. ATP Binding Cassette Transporters, ABC Transporters) so družina transmembranskih proteinov. Omogočajo izločanje različnih substratov iz citoplazme skozi celično membrano. Nahajajo se v različnih tkivih. Glavni predstavniki so P-glikoprotein (P-gp), družina proteinov povezanih z resistenco na več spojin (MRP) in resistantni protein izoliran pri raku na dojki (BCRP). Najbolj pomemben predstavnik ATP kasetnih prenašalcev je P-gp (Slika 8).

P-gp se nahaja na apikalni membrani enterocitov in povzroča izločanje določenih učinkovin (substratov za P-gp) nazaj v lumen GIT. Večje gensko izražanje P-gp so določili v distalnih delih črevesja, obstaja tudi velika interindividualna variabilnost v genskem izražanju P-gp. P-gp torej zmanjšuje biološko uporabnost učinkovin (substratov), najslabša biološka uporabnost pa je v primeru, če je učinkovina substrat za P-gp

**Preglednica 2:** substrati, inhibitorji in induktorji CYP3A4 (19).

**Table 2:** substrates, inhibitors and inducers of CYP3A4 (19).

Substrati	Inhibitorji	Induktorji
<i>Zaviralci kalcijevih kanalov:</i> diltiazem, felodipin, nifedipin, verapamil	<i>Makrolidi:</i> eritromicin, telitromicin, klaritromicin	<i>Barbiturati:</i> fenobarbital
<i>Imunosupresivi:</i> ciklosporin, sirolimus, takrolimus	<i>Inhibitorji proteaz:</i> indinavir,	<i>Ostali:</i>
<i>Kemoterapevtiki:</i> ciklofosfamid, docetaksel, doksorubicin, vinblastin	nelfinavir, ritonavir	fenitoin, hiperforin, tamoksifen,
<i>Benzodiazepini:</i> alprazolam, flunitrazepam, klonazepam, midazolam, tiazolam	<i>Ostali:</i> amiodaron, cimetidin,	pioglitazon, rifampicin,
<i>Antidepresivi:</i> amitriptilin, citalopram, fluoksetin, imipramin, sertralini	fluoksetin, fluvoksamin, klorfenikol,	
<i>Statini:</i> atorvastatin, lovastatin, simvastatin	kvercetin, nefazodon, sakvinavir,	
<i>Ostali:</i> alfentanil, amiodaron, buspiron, cisaprid, etinilestradiol, haloperidol, indinavir, metadon, pimoizid, risperidon, terfenadin, teofilin, venlafaksin, valprojska kislina ...	verapamil ...	



**Slika 7:** Nahajanje in smer prenosa s pomočjo različnih prenašalcev. Lumen GIT je hipotetično na sredini. P-glikoprotein (angl. P-glycoprotein, P-gp), resistantni protein izoliran pri raku na dojki (angl. breast cancer resistance protein, BCRP), peptidni prenašalec (angl. peptide transporter, PepT1), peptidni histidinski prenašalci (angl. peptide histidine transporter, PHT1), monokarboksilatni prenašalci (angl. monocarboxylate transporter, MCT), koncentracijski nukleozidni prenašalec (angl. concentrative nucleoside transporter, CNT), ravnotežni nukleozidni prenašalec (angl. equilibrative nucleoside transporter, ENT), proteinski prenašalec organskih anionov (angl. organic anion transporting protein, OATP), družina proteinov povezanih z resistenco na več spojin (angl. multiple resistance protein, MRP) (21).

**Figure 7:** Localization of intestinal drug transporters P-glycoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP), peptide transporter (PepT1), peptide histidine transporters (PHT1), monocarboxylate transporters (MCT), concentrative nucleoside transporter (CNT), equilibrative nucleoside transporter (ENT), organic anion transporting protein (OATP), multiple resistance protein (MRP) on the apical and basolateral membranes of the intestinal epithelial cells surrounding a hypothetical lumen. (21).

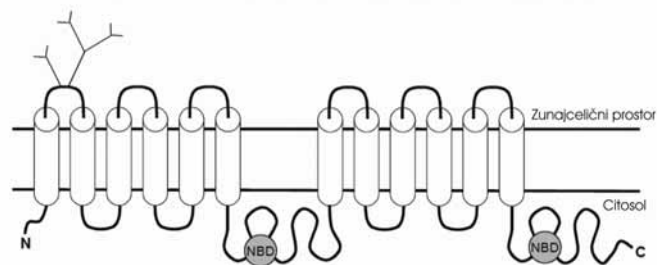
**Preglednica 3:** skupine z učinkovinami (substrati in inhibitorji), ki interagirajo s P-gp (21).

**Table 3:** list of compounds (substrates and inhibitors) that interact with P-gp (21).

Substrati	Inhibitorji
<p><i>Protitumorne učinkovine:</i> aktinomycin D, daunorubicin, doksorubicin, paklitaksel, vinblastin, vinkristin</p> <p><i>Statini:</i> atorvastatin, lovastatin, pravastatin, simvastatin</p> <p><i>Antihistaminiki:</i> feksofenadin, terfenadin</p> <p><i>Antidiaroiiki:</i> domperidon, loperamid, ondasetron</p> <p><i>Antibiotiki:</i> daktinomycin, eritromicin, grepafloksacin, ivermektin, itrakonazol, ketokonazol, valinomicin</p> <p><i>Inhibitorji HIV proteaz:</i> amprenavir, indinavir, ritonavir, sakvinavir</p> <p><i>Steroidi:</i> aldosteron, deksametazon, hidrokortizon, kortizol, kortikosteron</p> <p><i>Kardio učinkovine:</i> digoksin, digitoksin, kinidin</p> <p><i>Analgetiki:</i> asimadolin, fentanil, morfin</p> <p><i>Beta antagonist:</i> bunitrolol, celiprolol, karvedilol, talinolol</p>	<p><i>Imunosupresivi:</i> ciklosporin A, gramicidin, valinomicin</p> <p><i>Sestavine hrane:</i> piperin, kvercetin, naringin, kurkumin, bergamotin, kamferol, rutin</p> <p><i>Pomožne snovi:</i> Tween 20, Tween 80, Nonidet P-40, Akacia, polietilenglikoli, Triton-X 100, blok kopolimeri, Brij 30, 35, solutol HS 15, poloksameri</p>

in CYP3A4, saj hkrati potekata metabolizem učinkovine v enterocitu in izločanje s P-gp.

Sočasna uporaba učinkovine (substrata) in inhibitorja P-gp pa lahko vodi do povečane koncentracije učinkovine (substrata) v plazmi in možnosti pojava neželenih učinkov. Tako so opazili dvig koncentracije digoksina v plazmi (substrat) ob sočasni uporabi inhibitorja PSC833 (valsopodar). Inhibitorji delujejo preko znižanja genskega izražanja P-gp ali po principu kompetitivne in nekompetitivne inhibicije. Nekatere pomožne snovi, predvsem površinsko aktivne snovi (Tween 80) in sotopila (polietilenglikoli) lahko tudi inhibirajo P-gp, verjetno preko spremembe fluidnosti membrane. Obstaja še možnost interakcije s snovmi v prehrani. V primeru talinolola, ob sočasnem pitju soka grenivke (inhibitor P-gp), sta se povečali najvišja plazemska koncentracija ( $C_{max}$ ) in površina pod krivuljo (AUC), skrajšal se je čas, potreben da je dosežena najvišja plazemska koncentracija ( $t_{max}$ )



**Slika 8:** struktura P-gp; dve glavni domeni s po šest enotami, dve vezavni mesti za ATP (angl. NBD-nucleotide binding site), N-glikozilirani del se nahaja na prvi zanki-levo, v zunajceličnem prostoru (20).

**Figure 8:** Topology of P-gp. P-gp has been proposed to be composed of two symmetrical halves, each with six transmembrane segments and one cytoplasmic nucleotide-binding site (NBD). The N-glycosylation sites are located in the first extracellular loop (20).

talinolola. Podobno se je zgodilo tudi v kombinaciji fenitoina in popra, ki vsebuje inhibitor P-gp, piperin.

Obstajajo tudi induktorji P-gp genskega izražanja kateri povzročijo padec koncentracije učinkovine (substrata) v plazmi, saj je več P-gp na enterocitih in večje je izločanje. Primer je kombinacija rifampina in fenoksfenadina kjer rifampin inducira gensko izražanje P-gp in tako zmanjša biološko uporabnost fenoksfenadina, ki je substrat za P-gp (20,21).

Naslednji predstavnik ATP kasetnih prenašalcev je družina proteinov povezanih z resistenco na več spojin (angl. multiple resistance protein, MRP). Do danes so odkrili devet poddružin (MRP1-MRP9). Nahajajo se na apikalni in bazolateralni strani enterocitov in so odgovorni za izločanje in zmanjšano absorpcijo učinkovin, predvsem protitumorih (vinca alkaloidi, antraciklini, kamfotericin, metotreksat). Kot izločevalna prenašalca sta najbolj pomembna MRP1 in MRP2. Substrati za MRP so tudi glukuronirani konjugati bilirubina, estradiola, paracetamola, grepafloksacina in anionske učinkovine irinocetan, pravastatin, ampicilin. Nekateri inhibitorji MRP so verapamil, benzbromaron in sulfipirazon (21).

Tretji predstavnik ATP kasetnih prenašalcev je resistentni protein izoliran pri raku na dojki (angl. breast cancer resistance protein, BCRP). Nahaja se na apikalni strani endotelnih celic tankega črevesja in kolona kjer sodeluje pri izločanju učinkovin. Izražanje gena za BCRP je večje v jejunumu in se niža proti kolonu. Obstaja velika interindividualna variabilnost in razlika glede na spol. Substrati so predvsem protitumorne učinkovine (mitoksantron, metotreksat, kamfotericini), fiziološki substrati (Estron-3-sulfat, 17 -estradiol sulfat, folna kislina). Inhibitorji, s katerimi se absorpcija substratov poveča so dietilstilbestrol, taksani, flavonoidi, imatinib, gefitinib, fumitremorgin C, tamoksifen, inhibitorji HIV proteaze, novobiocin. Induktorjev je manj znanih, primer je kurkumin (21).

Protitumorne učinkovine redko vgrajujemo v pripravke s podaljšanim sproščanjem, zato BCRP in MRP pri teh pripravkih nimata tako kritičnega pomena.

### Prenašalni nosilci topljencev, SLC

Prenašalni nosilci topljencev (angl. solute carrier transporters, SLC) so družina integralnih membranskih proteinov, ki se nahajajo na apikalni strani enterocitov in izboljšajo prenos substratov skozi površino celic ali

površino celičnih organelov z olajšano difuzijo ali aktivnim transportom v celico. Udeleženi so tudi pri soprenosu ionov v nasprotni smeri elektrokemijskega gradienta. Sodelujejo pri prenosu aminokislin, peptidov, sladkorjev, vitaminov, žolčnih kislin, nevrottransmitterjev in različnih ksenobiotikov. Prenašalci te skupine torej olajšajo, povečajo absorpcijo substratov. Skupine SLC prenašalcev so od protona odvisni oligopeptidni prenašalci (angl. proton dependent oligopeptide transporters, SLC15A), prenašalci organskih kationov (angl. organic cation transporters, SLC22A), prenašalni polipeptidi organskih anionov (angl. organic anion transporting polypeptides, SLC21A), prenašalci nukleozidov (angl. nucleoside transporters, SLC28, 29A) in monokarboksilatni prenašalci (angl. monocarboxylate transporters, SLC16A). Te prenašalce smo tu poimenovali glede na gen, ki kodira določen prenašalec. Prenašalce torej poimenujemo glede na gen, ki ga kodira, ali pa glede na mehanizem delovanja, na primer, ATP kasetni prenašalci.

S farmakokinetičnega vidika je za biološko uporabnost najbolj pomembna družina SLC15A in znotraj nje peptidni prenašalec (angl. peptide transporter, PepT1). Substrati in inhibitorji za PepT1 so prikazani v Preglednici 4 (21). Inhibitorji delujejo po principu kompetitivne ali nekompetitivne inhibicije.

Prenašalci organskih kationov (SLC22A) in prenašalni polipeptidi organskih anionov (SLC22A) interagirajo z različnimi endogenimi substrati in učinkovinami iz skupin nesteroidnih protivnetnih učinkovin, -laktamskih antibiotikov, protivirusnih učinkovin in zaviralcev angiotenzinske konvertaze.

Prenašalci nukleozidov (SLC28, 29A) izboljšajo absorpcijo purinskih in pirimidinskih nukleozidov, kamor spadajo protivirusne učinkovine (didanozin, ribavarin, zidovudin, zalcitabin) in protitumorne učinkovine (citarabin, gemcitabin, 5-florouridin, fludarabin).

Monokarboksilatni prenašalci (SLC16A) so pomembni pri absorpciji -laktamskih antibiotikov (penicilin), valprojske kisline, atorvastatina in nateglinida. Pomembni so tudi pri transportu endogenih kislin kot so mlečna kislina, piruvat, acetoacetat, butirat (21).

## 4 Primeri IVIVC

Glede na množico dejavnikov, ki lahko vplivajo na uspešnosti IVIVC, se na prvi pogled zdi možnost IVIVC za učinkovine v pripravkih s

**Preglednica 4:** skupine z učinkovinami (substrati in inhibitorji), ki interagirajo s PepT1 (21).

**Table 4:** List of compounds (substrates and inhibitors) that interact with PepT1 (21).

Substrati	Inhibitorji
<i>Cefalosporini:</i> cefaklor, cefadroksil, cefamandol, cefaleksin, cefradin, moksalaktam	latamoksef
<i>Penicilini:</i> benzilpenicilin, dikloksacilin, kloksacilin, metampicilin, oksacilin, propicilin	karbenicilin
<i>Zaviralci angiotenzinske konvertaze:</i> benazepril, enalapril, fosinopril, kaptopril, kvinalapril	benazeprilat, enalaprilat, fosinoprilat, kvinalaprilat
<i>Protivirusne učinkovine:</i> valciklovir, valganciklovir	
<i>Ostali:</i> bestatin, $\alpha$ -metildopa fenilalanin, Pro-Phe-Alendronat, inhibitorji renina, inhibitorji trombina, tirotropin sproščajoči hormoni	glibenklamid, nateglinid

podaljšanim sproščanjem, ki so substrati za metabolične encime ali prenašalce, majhna. Pristop k IVIVC za takšne pripravke mora biti celovit in multidisciplinaren. Kompleksnost pristopa je verjetno tudi razlog, da v literaturi še ni veliko objavljenih podatkov. Pogosto neuspešne IVIVC pa tudi niso objavljene.

Pristop k določanju IVIVC lahko najbolje predstavimo na primeru. V primeru škrobne ogrodne tablete z diltiazemom so želeli ugotoviti »in vivo« lastnosti sproščanja diltiazema iz ogrodne tablete, ga primerjati z »in vitro« podatki ter določiti stopnjo IVIVC (22). Pripravili so tri vrste škrobnih ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem, ki so se razlikovale glede na hitrost sproščanja »in vitro« (hitra, vmesna in počasna). Predpogoj za ugotavljanje IVIVC je predhodno razvit test raztapljanja, ki simulira »in vivo« pogoje v GIT in je diskriminatorev v tem smislu, da pokaže razlike med preiskovanimi tabletami. S testom raztapljanja (angl. dissolution test) spremljamo sproščanje učinkovine iz pripravka in njeno nadaljnje raztapljanje. Test raztapljanja so razvijali na podlagi lastnosti učinkovine, sestave tablet in »in vivo« pogojev v GIT. Z razvitim testom raztapljanja so testirali vse tri tablete in dobili profile raztapljanja (delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa). Vse tri vrste ogrodnih tablet so nato preskusili v farmakokinetični študiji na ljudeh in iz plazemskih vzorcev določili delež absorbirane učinkovine v odvisnosti od časa. V nadaljevanju so primerjali »in vitro« profile, pridobljene s testom raztapljanja in profile »in vivo« ter določili stopnjo korelacije. Ugotovili so stopnjo korelacije A, kar pomeni dobro korelacijo. Tako razvit model IVIVC se v nadaljevanju lahko uporabi za napovedovanje »in vivo« farmakokinetičnih parametrov zgolj na podlagi testa raztapljanja »in vitro« (22).

Več primerov določanja IVIVC je prikazanih v Preglednici 5 (22-38). Iz podatkov v Preglednici 5 je razvidno, da je večina učinkovin, ki se vgrajujejo v sisteme s podaljšanim sproščanjem iz BCS razreda I in manj iz BCS razreda II. Za učinkovine iz BCS razredov III in IV pa

zaenkrat še ni na voljo podatkov. Izjema so tablete s podaljšanim sproščanjem, ki vsebujejo metformin (BCS razred III), kjer so bili uspešni in IVIVC dosegli. Metformin tako lahko služi kot modelni primer za učinkovine, ki imajo slabo permeabilnost in ozko absorpcijsko okno, absorpcija poteka le v tankem črevesju (35).

Ocena IVIVC v Preglednici 5 je podana glede na stopnjo korelacije tako kot je definirana s smernicami FDA, ameriške agencije za hrano in zdravila. Stopnja A velja za najvišjo stopnjo korelacije, kjer vsaka točka na »in vitro« profilu raztapljanja ustreza točki na »in vivo« profilu raztapljanja učinkovine iz pripravka. Stopnja B vključuje primerjavo vrednosti povprečnega časa, ko je raztopljena vsa učinkovina (MDT, mean dissolution time) »in vitro« in povprečnega časa zadrževanja učinkovine v telesu (MRT, mean residence time) ali časa raztapljanja »in vivo«. Lahko se primerja tudi hitrostno konstanto raztapljanja »in vitro« s hitrostno konstanto absorpcije »in vivo«. Stopnja C pa opisuje samo korelacijo v eni točki, na primer, količino raztopljene učinkovine v določenem času »in vitro« z nekim farmakokinetičnim parametrom »in vivo«. Obstaja še večkratna stopnja korelacije C, ki povezuje količino raztopljene učinkovine »in vitro« v več časovnih točkah z več farmakokinetičnimi podatki npr. površino pod krivuljo v različnih časovnih intervalih (39).

## 5 Zaključek

Na podlagi dosegljivih podatkov v literaturi lahko zaključimo, da je IVIVC za dobro stopnjo korelacije za učinkovine v pripravkih s podaljšanim sproščanjem, ki se intenzivno metabolizirajo ali vežejo na transportne proteine, možno doseči, predvsem v primerih, ko gre za učinkovine iz BCS razredov I in II. Na splošno pa ni veliko podatkov o IVIVC, za kar je verjetno krivo dejstvo, da se testiranja IVIVC bolj intenzivno izvajajo šele zadnja leta. Za izvajanje IVIVC je potrebno pridobiti »in vivo« podatke; takšne študije so drage, sama industrija pa

**Preglednica 5:** Različni primeri IVIVC za učinkovine v pripravkih s podaljšanim sproščanjem, ki se bolj metabolizirajo ali vežejo na transportne proteine.

**Table 5:** Various IVIVC examples for drugs in extended release formulations which are extensively metabolized or absorbed with transporters.

Učinkovina	Sistem	BCS	Metabolizem	IVIVC	VIR
Diltiazem	Škrobna ogrodna tableta	I	Inhibitor, substrat CYP3A4	Stopnja korelacije A	22
Paracetamol	Tableta Ring Cap®	I	Substrat za MRP in CYP3A4	Stopnja korelacije A	23
Teofilin	Hidrofilna ogrodna tableta	I	Substrat za CYP3A4	Stopnja korelacije A	24
Metoprolol	Hidrofilna ogrodna tableta	I	Substrat za CYP2D6	Različne stopnje korelacije	25, 26
Valprojska kislina	Hidrofilna ogrodna tableta	I	Substrat za MCT in CYP3A4	Stopnja korelacije A	27
Diltiazem	Pelete obložene z etil celulozo	I	Inhibitor, substrat CYP3A4	Različne stopnje korelacije	28
Rifampicin	Pelete obložene z etil celulozo	II	Induktor CYP3A4	Stopnja korelacije A	29
Karbamazepin	Hidrofilna ogrodna tableta	II	Substrat in induktor CYP3A4	Stopnja korelacije A	30
Buspiron	Hidrofilna ogrodna tableta	I	Substrat za CYP3A4	Stopnja korelacije A za C <sub>max</sub>	31
Nilvadipin	Hidrofilna ogrodna tableta	II	Substrat za CYP3A4	Stopnja korelacije A (študija na psih)	32
Propranolol	Hidrofilna ogrodna tableta	I	Intenziven metabolizem v jetrih	Stopnja korelacije A (študija na psih)	33
Verapamil	Obložene pelete, ogrodne tablete	I	Substrat in inhibitor za CYP3A4, substrat za P-gp	Stopnja korelacije C	34
Metformin	Pelete obložene z etilcelulozo	III	Omejena permeabilnost, absorpcijsko okno	Stopnja korelacije A, C	35



zaradi patentnih situacij in varovanja podatkov izsledkov študij ne objavi v celoti ali jih objavi veliko kasneje. FDA smernice za IVIVC so bile določene leta 1997 in mogoče jih bodo morali prilagoditi na nove pripravke in učinkovine, kajti stopnjo korelacije A ni vedno možno doseči, kljub temu pa lahko s IVIVC modelom dobro napovemo posamezne farmakokinetične parametre. V prihodnosti zato pričakujemo še bolj intenzivno raziskovanje področja IVIVC, za učinkovine s različnimi biofarmaceutskimi lastnostmi, ki jih vgrajujemo v pripravke s podaljšanim sproščanjem.

## 6 Literatura

1. EMEA. Note for guidance on quality of modified release products: A: Oral dosage forms, B: Transdermal dosage forms section 1 (Quality), CPMP/QWP/604/96, London, 29 July, 1999.
2. Emami J. In vitro - in vivo correlation: from theory to applications. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2006; 9 (2): 31-51.
3. Dasbach T and Davidson J. The effect of dissolution media on drug release from CR tablets. *KSP and CRS joint symposium on recent advances in drug delivery and biomaterials, Seoul, Korea, September 24 - 26, 1997.*
4. Nokhodchia A, Norouzi-Sania S, Reza M, Siahi-Shadbada, Lotfipoora F, Saeedi M. The effect of various surfactants on the release rate of propranolol hydrochloride from hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)-Eudragit matrices. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 54: 349-356.
5. Kayijama A, Takagi H, Moribe K, Yamamoto K. Improvement of HPMC tablet disintegration by the addition of inorganic salts. *Chem Pharm Bull* 2008; 56(4): 598-601.
6. Kavanagh N, Corrigan OI. Swelling and erosion properties of hydroxypropylmethylcellulose (Hypromellose) matrices—influence of agitation rate and dissolution medium composition. *Int J Pharm* 2004; 279: 141-152.
7. Abrahamsson B, Roos K, Sjogren J. Investigation of prandial effects on hydrophilic matrix tablets. *Drug Dev Ind Pharm* 1999; 25(6): 765-771.
8. Wonnemann M, Schug B, Schmücker K, Brendel E, Zwieten PA, Blume H. Significant food interactions observed with a nifedipine modified-release formulation marketed in the European Union. *Int J Clin Pharm Ther* 2006; 44 (1): 38-48.
9. Dokumetzidis A, Macheras P. IVIVC of controlled release formulations: Physiological-dynamical reasons for their failure. *J Con Rel* 2008; 129: 76-78.
10. Christopher Porter JH, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and lipid based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature reviews Drug discovery* 2007; 6(3): 231-248.
11. Abrahamsson B, Lennernas H. The biopharmaceutical classification system. In: Testa B, Waterbeemd H. ADME-Tox approaches 5: Comprehensive medicinal chemistry II. Elsevier, 2006: 971-988.
12. Corrigan OI. The biopharmaceutical drug classification and drugs administered in extended release (ER) formulations. *Adv Exp Med Biol* 1997; 423: 111-128.
13. Takagi T et al. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain and Japan. *Mol Pharm* 2006; 3(6): 631-643.
14. Leslie Z. Using the BDDCS to predict when metabolism and drug transport influence the disposition of a drug. AAPS workshop on drug transporters in ADME: from the bench to the bedside, March 8, 2005.
15. Wu X, Whitfield LR, Stewart BH. Atorvastatin transport in the Caco-2 cell model: contributions of P-glycoprotein and the proton-monocarboxylic acid co-transporter. *Pharm Res* 2000;17(2): 209-215.
16. Balimane PV, Chong S. Evaluation of permeability and P-glycoprotein interactions. In: Krishna R, Yu R. *Biopharmaceutics applications in drug development.* Springer science, 2008: 101-138.
17. Wilding IR. Evolution of the biopharmaceutics classification system (BCS) to oral modified release (MR) formulations; what do we need to consider? *Eur J Pharm Sci* 1999; 8: 157-158.
18. Peternel L, Mrhar A, Kristl A. Metabolične pregrade pri absorpciji učinkovin iz prebavnega trakta. *Farm Vest* 2003; 54: 189-198.
19. Flockhard DA. Drug Interactions, Cytochrome P450 drug interactions table. Indiana University School of Medicine, 2007 (<http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>).
20. Amo EM, Heikkinen AT, Monkkonen J. In vitro-in vivo correlation in p-glycoprotein mediated transport in intestinal absorption. *Eur J Pharm Sci* 2009; 36: 200-211.
21. Bhardwaj RK et al. Intestinal transporters in drug absorption. In: Krishna R, Yu R. *Biopharmaceutics applications in drug development.* Springer science, 2008: 175-261.
22. Korhonen O, Kanerva H, Vidgren M, Urtti A, Ketolainen J. Evaluation of novel starch acetate-diltiazem controlled release tablets in healthy human volunteers. *J Contr Rel* 2004; 95: 515- 520.
23. Dalton JT, Straughn AB, Dickason DA, Grandolfi GP. Predictive ability of level A *In Vitro-in Vivo* correlation for RingCap controlled-release acetaminophen tablets. *Pharm Res* 2001; 18(12): 1729-1734.
24. Souliman S, Beyssac E, Cardot JM, Denis S, Alric M. Investigation of the biopharmaceutical behavior of theophylline hydrophilic matrix tablets using USP methods and an artificial digestive system. *Drug Dev Ind Pharm* 2007; 33: 475-483.
25. Sirisuth N, Eddington ND. The influence of first pass metabolism on the development and validation of an IVIVC for metoprolol extended release tablets. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 53: 301-309.
26. Mahayni H, Rehki GS, Uppoor GR, Marroum P, Hussain AS, Augsberger LL, Eddington ND. Evaluation of "external" predictability of an in vitro-in vivo correlation for an extended-release formulation containing metoprolol tartrate. *J Pharm Sci* 2000; 89(10): 1354-1361.
27. Dutta S, Qiu Y, Samara E, Cao G, Granneman GR. Once-a-day extended-release dosage form of divalproex sodium III: development and validation of a level A in vitro-in vivo correlation (IVIVC). *J Pharm Sci* 2005; 94 (9): 1949-1956.
28. Sirisutha N, Augsburger LL, Eddington ND. Development and Validation of a non-linear IVIVC model for a diltiazem extended release formulation. *Biopharm Drug Dispos* 2002; 23: 1-8.
29. Sreenivasa Rao B, Seshasayana A, Pardha Saradhi SV, Ravi Kumar N, Narayan CPS, Ramana Murthy KV. Correlation of 'in vitro' release and 'in vivo' absorption characteristics of rifampicin from ethylcellulose coated nonpareil beads. *Int J Pharm* 2001; 230: 1-9.
30. Veng-Pedersena P, Gobburub JVS, Meyer MC, Straughn AC. Carbamazepine level-A *In vivo-In vitro* correlation (IVIVC): A scaled convolution based predictive approach. *Biopharm Drug Dispos* 2000; 21: 1-6.
31. Takka S, Sakr A, Goldberg A. Development and validation of an in vitro-in vivo correlation for buspirone hydrochloride extended release tablets. *J Contr Rel* 2003; 88: 147-157.
32. Tanaka N, Imai K, Okimoto K, Ueda S, Tokunaga Y, Ibuki R, Higaki K, Kimura T. Development of novel sustained-release system, disintegration-controlled matrix tablet (DCMT) with solid dispersion granules of nilvadipine (II): In vivo evaluation. *J Contr Rel* 2006; 112: 51-56.
33. Huang YB, Tsai YS, Yang WC, Chang JC, Wu PC, Takayama K. Once-daily propranolol extended-release tablet dosage form: formulation design and in vitro/in vivo investigation. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 607-614.
34. Langguth P, Bolger M, Tubic M, Biowaiver for BCS class II compounds? Application of simulation for BCS classification. <http://www.aapspharmaceutica.com/meetings/files/90/29Langguth.pdf>
35. Balan G, Timmins P, Greene DS, Marathe PH. In vitro-in vivo correlation (IVIVC) models for metformin after administration of modified-release (MR) oral dosage forms to healthy human volunteers. *J Pharm Sci* 2001; 90(8): 1176-85.
36. Okumu A, DiMaso M, Löbenberg R. Dynamic dissolution testing to establish in vitro/in vivo correlations for montelukast sodium, a poorly soluble drug. *Pharm Res* 2008; 25(12): 2778-2785.
37. Wei H, Lobenberg R. Biorelevant dissolution media as a predictive tool for glyburide a class II drug. *Eur J Pharm Sci* 2006; 29: 45-52.
38. Rouini MR, Ardakani YH, Mirfazaelian A, Hakemi L, Baluchestani M. Investigation on different levels of in vitro-in vivo correlation: gemfibrozil immediate release capsule. *Biopharm Drug Dispos* 2008; 29: 349-355.
39. Cardot JM, Beyssac E, Alric M. In vitro-in vivo correlation: importance of dissolution in IVIVC. *Dissolution Technologies*, February 2007: 15-19.