



Technische  
Universität  
Braunschweig



Institut für Pharmazeutische Technologie  
pharmazie in braunschweig



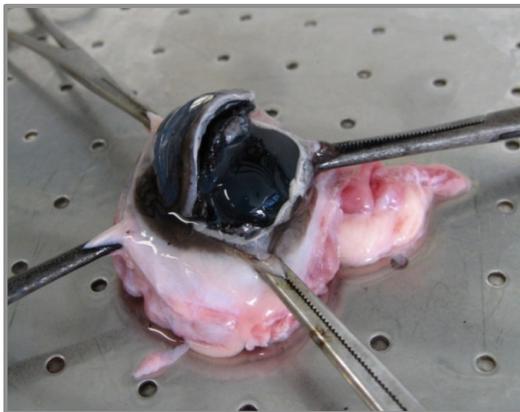
# Zellkulturmodelle epithelialer Barrieren für die präklinische Arzneimittelentwicklung

PD Dr. Stephan Reichl Institut für Pharmazeutische Technologie TU Braunschweig  
Braunschweig 10.02.2016

# Experimentelle Bestimmung pharmakokinetischer Parameter (in-vivo/ex-vivo)



- In-vivo-Versuchstier ist das Kaninchen
- Pro Formulierung werden mindestens 36 Kaninchen benötigt.
- E nukleation nach festem Zeitschema, Dissektion und Analytik der Arzneistoffkonzentration in den okulären Geweben und Flüssigkeiten



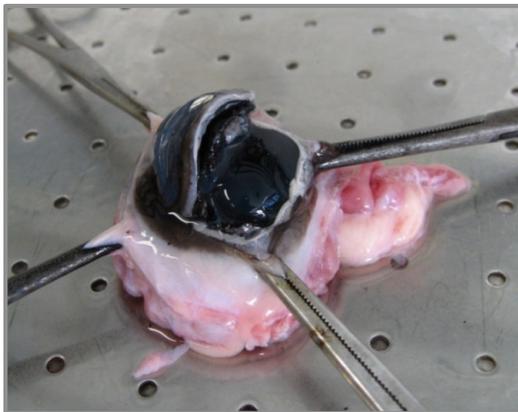
- Ex-vivo-Versuche mittels Cornea-Exzidaten (Kaninchen und Schwein)
- Pro Formulierung werden mindestens 6 Tiere benötigt.
- E nukleation, Ussing-Kammer-system, Bestimmung des trans-cornealen Arzneistofftransports



# Nachteile von Versuchen am Tier



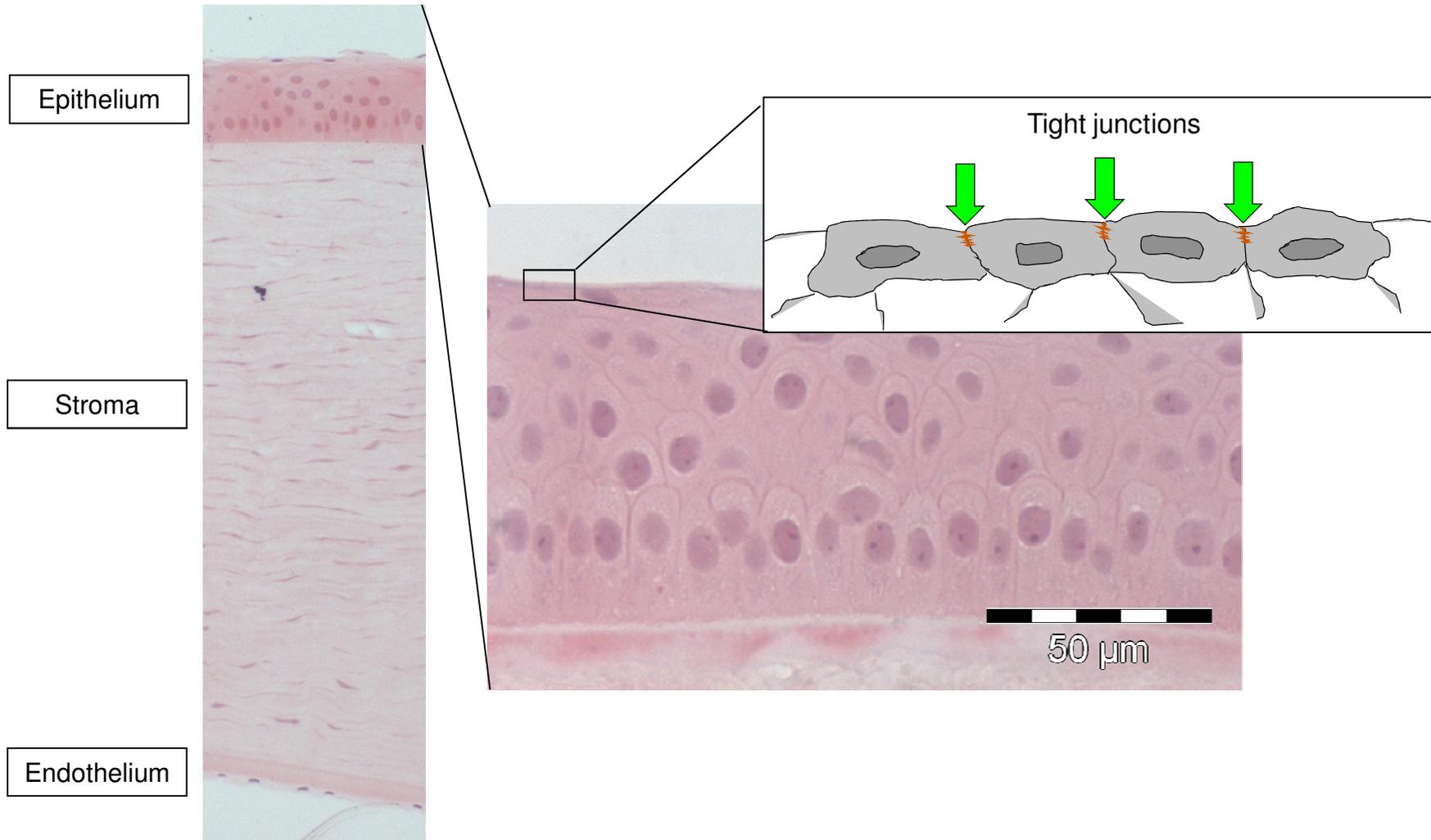
- Ethische Bedenken
- Problem der Standardisierung und hohe Variabilität
- Problem der Transferierbarkeit auf die humane Situation
- hohe Kosten



**Wie lassen sich valide In-vitro-Zellkulturmodelle etablieren?**



# Humane Cornea



Reichl S. et al. (2011) Expert Opin Drug Metab Toxicol 7:559-578



Technische  
Universität  
Braunschweig

Braunschweig 10.02.2016 | S. Reichl

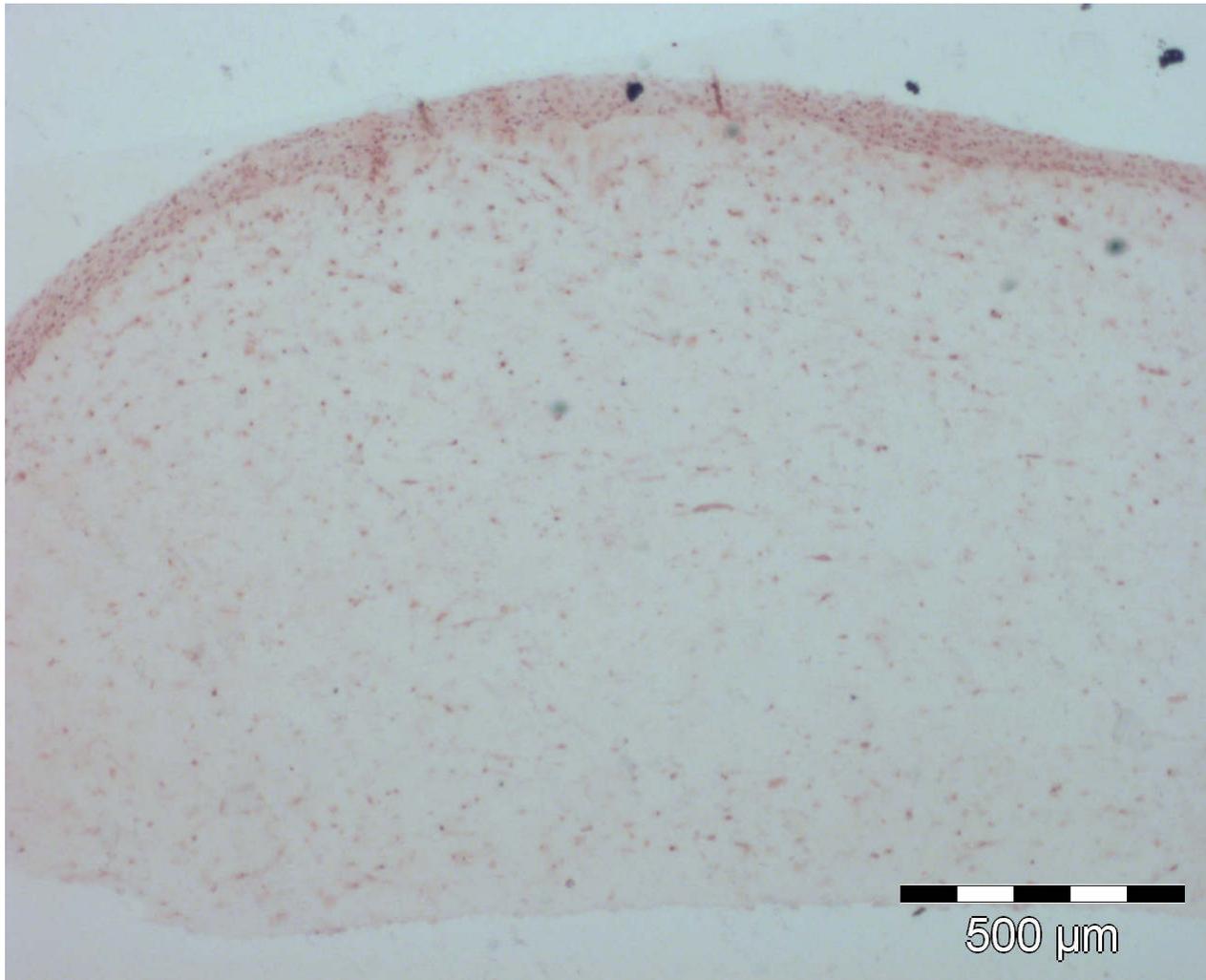


Institut für Pharmazeutische Technologie  
pharmazie in braunschweig

# Anforderungen an ein valides corneales Zellkulturmodell für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsstudien

- KISS Prinzip „Keep it simple and significant“
- Immortalisierte Zelllinien (human)
- Serumfreie Kultivierung
- Ausgeprägte Expression der Tight junctions (hohe transepitheliale elektrische Resistenz TEER)
- Hohe Äquivalenz der organotypischen Eigenschaften (Epithel plus Stroma)
- Äquivalenz der Permeabilität zum Ex-vivo-Gewebe (Marker)
- Reproduzierbarkeit, Geringe Intra- und Interlaborvarianz
- Vergleichbare Expressionsmuster von Transportproteinen (ABC transporter) und metabolisierenden Enzymen (Phase I und II) wie Ex-vivo-Gewebe

# Histologie Hemicornea



Epithel

Stroma-  
Biomatrix

500 µm

Reichl S. (2008) J Pharm Pharmacol 60:299-307



Technische  
Universität  
Braunschweig

Braunschweig 10.02.2016 | S. Reichl

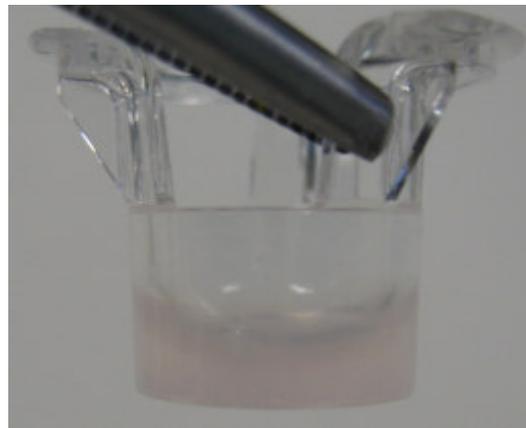


Institut für Pharmazeutische Technologie  
pharmazie in braunschweig

# Vergleich HC Modell und exzidierte Cornea

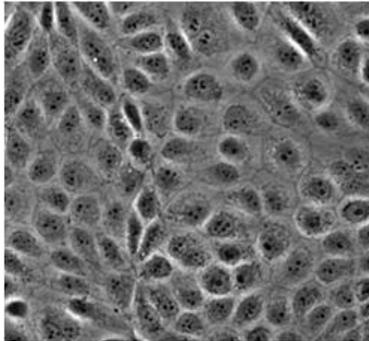
Permeationskoeffizient  $P_{app}$  [cm/s]

Marker Substance	Hemicornea	Porcine Cornea	Rabbit Cornea
Rhodamine B	$9.80 \pm 0.72 \times 10^{-6}$	$5.43 \pm 1.26 \times 10^{-6}$	$13.49 \pm 2.11 \times 10^{-6}$
Sodium fluorescein	$1.98 \pm 0.45 \times 10^{-7}$	$1.75 \pm 1.51 \times 10^{-7}$	$3.76 \pm 1.12 \times 10^{-7}$
FD-4	$4.96 \pm 1.46 \times 10^{-8}$	$1.67 \pm 0.43 \times 10^{-8}$	$9.08 \pm 4.88 \times 10^{-8}$

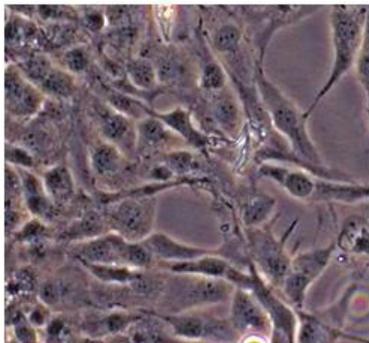


# Prävalidierung

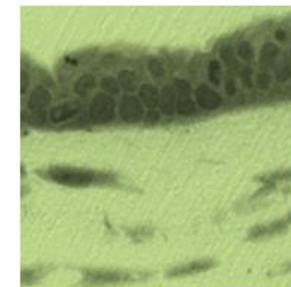
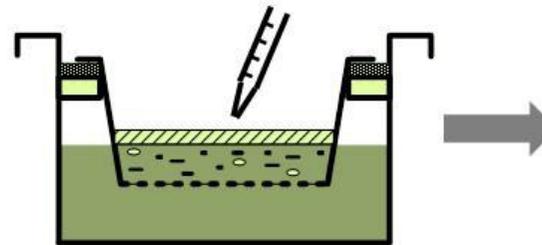
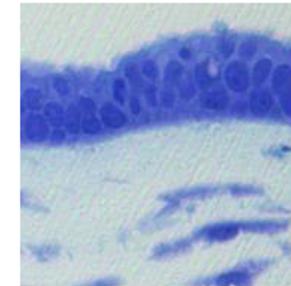
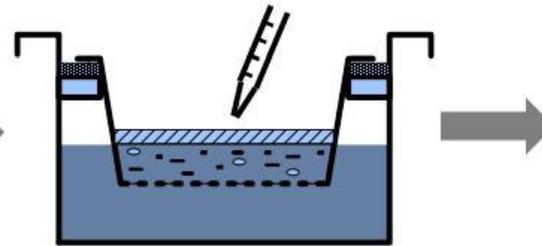
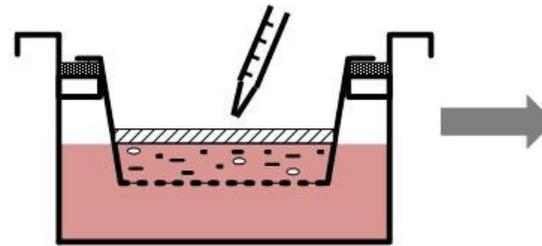
Corneal epithelial cells



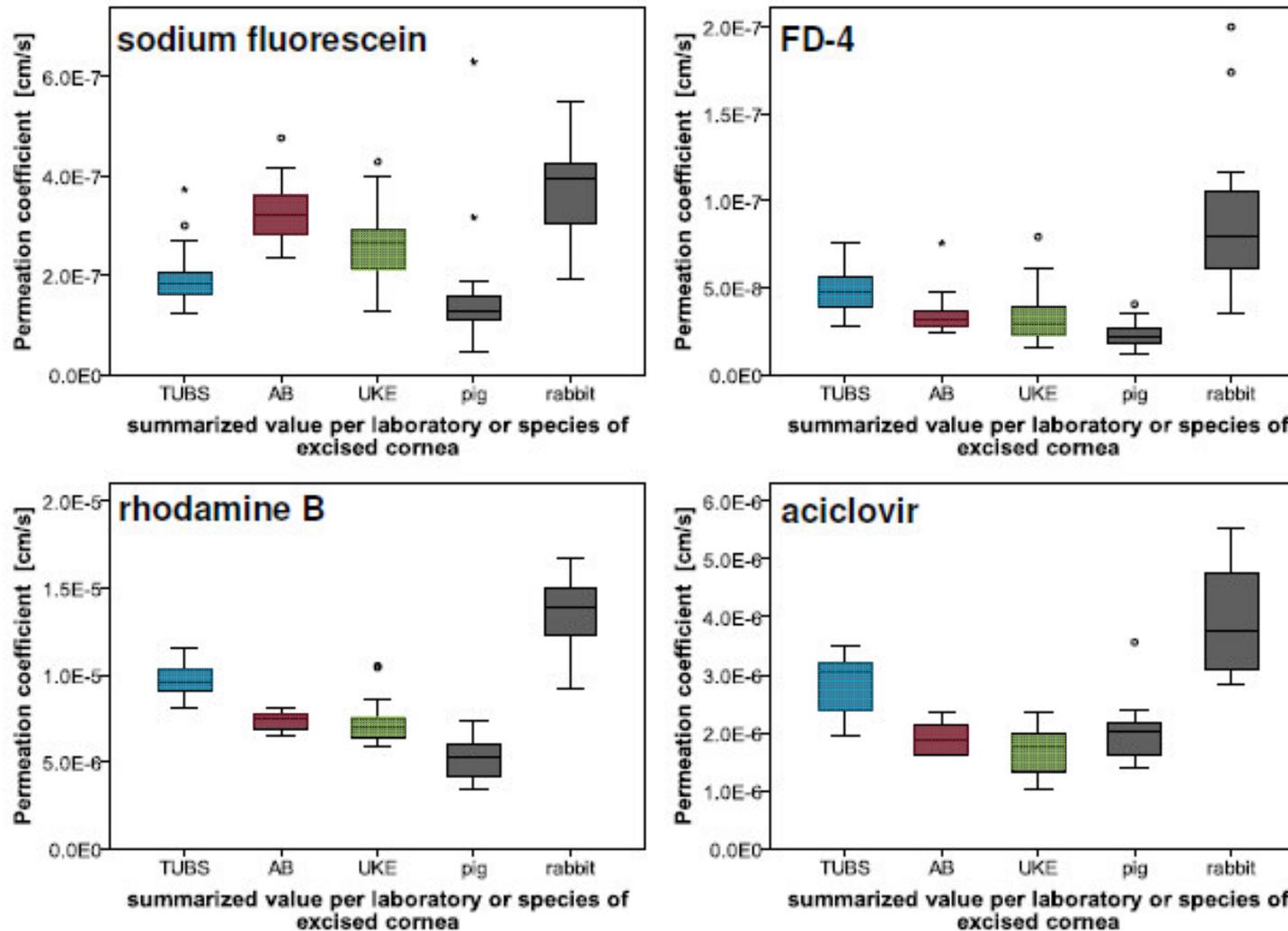
Keratocytes



Cultivation in 3 laboratories

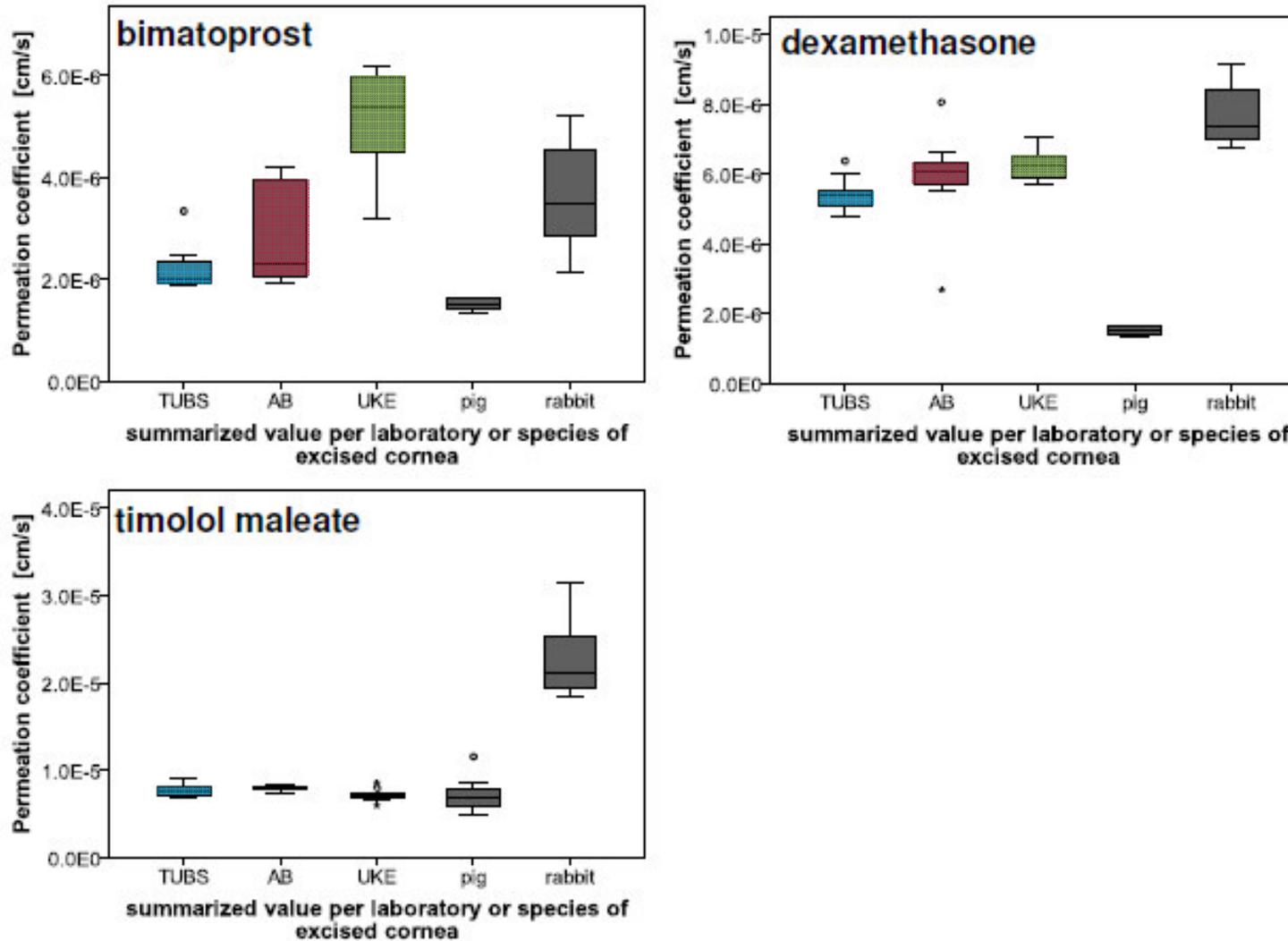


# Interlaborvariabilität und Vergleich zu Ex-vivo-Cornea



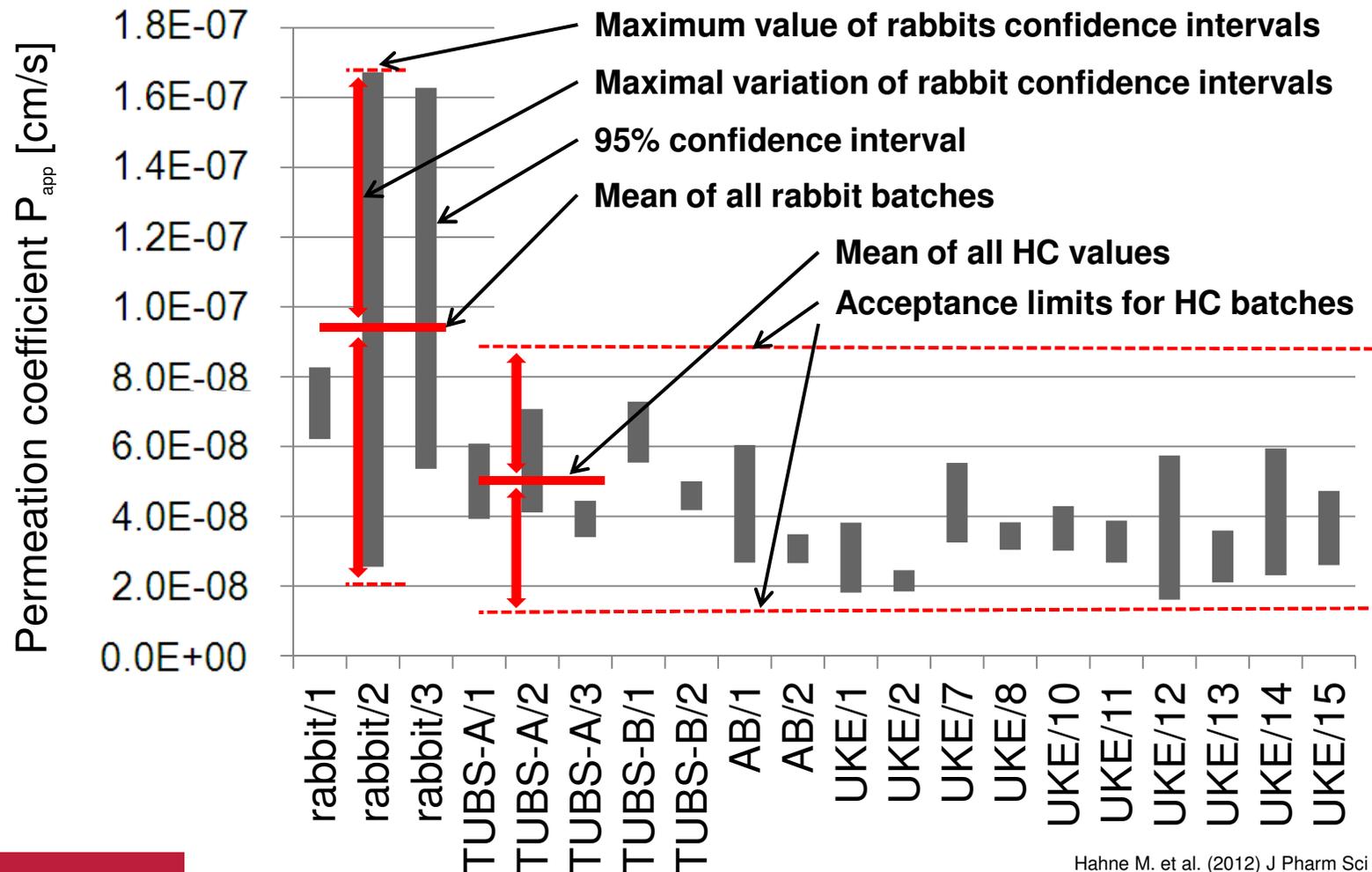
Hahne M. et al. (2012) J Pharm Sci 101:2976-2988

# Interlaborvariabilität und Vergleich zu Ex-vivo-Cornea



# Äquivalenztest

FD-4: 95% Konfidenzintervalle der Hemicornea- und Kaninchen-Einzelchargen



Hahne M. et al. (2012) J Pharm Sci 101:2976-2988



Technische  
Universität  
Braunschweig

Braunschweig 10.02.2016 | S. Reichl



Institut für Pharmazeutische Technologie  
pharmazie in braunschweig

# Expression von ABC Transportproteinen

	MDR1			MRP1			MRP2			MRP3			MRP4			MRP5			BCRP		
Hemicornea Construct	◇	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	◇	+
Porcine Cornea	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	◇	-	+	+	+	+	+	-	◇	-	-
Rabbit Cornea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	◇	-	-	-	-	◇	◇	+	-	-	-
HEC	◇	-	/	+	◇	/	+	-	/	+	◇	/	◇	◇	/	+	◇	/	+	◇	/
	mRNA	Protein	Functionality																		

+: Detected  
 -: Not Detected  
 ◇: Weak Detection  
 /: Not tested, Tissue not available

Verstraelen J., Reichl S. (2013) Int J Pharm 441:765-775  
 Verstraelen J., Reichl S. (2014) Mol Pharm 11:2160-2171

# Expression von ABC Transportproteinen

	MDR1			MRP1			MRP2			MRP3			MRP4			MRP5			BCRP		
Hemicornea Construct	◇	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	◇	+
Porcine Cornea	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	◇	-	+	+	+	+	+	-	◇	-	-
Rabbit Cornea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	◇	-	-	-	-	◇	◇	+	-	-	-
HEC	◇	-	/	+	◇	/	+	-	/	+	◇	/	◇	◇	/	+	◇	/	+	◇	/
	mRNA	Protein	Functionality																		

+: Detected  
 -: Not Detected  
 ◇: Weak Detection  
 /: Not tested, Tissue not available

Verstraelen J., Reichl S. (2013) Int J Pharm 441:765-775  
 Verstraelen J., Reichl S. (2014) Mol Pharm 11:2160-2171

# Expression von ABC Transportproteinen

	MDR1			MRP1			MRP2			MRP3			MRP4			MRP5			BCRP		
Hemicornea Construct	◇	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	◇	+
Porcine Cornea	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	◇	-	+	+	+	+	+	-	◇	-	-
Rabbit Cornea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	◇	-	-	-	-	◇	◇	+	-	-	-
HEC	◇	-	/	+	◇	/	+	-	/	+	◇	/	◇	◇	/	+	◇	/	+	◇	/
	mRNA	Protein	Functionality																		

+: Detected  
 -: Not Detected  
 ◇: Weak Detection  
 /: Not tested, Tissue not available

Verstraelen J., Reichl S. (2013) Int J Pharm 441:765-775  
 Verstraelen J., Reichl S. (2014) Mol Pharm 11:2160-2171

# Zusammenfassung

- Entwicklung eines dreidimensionalen organotypischen Corneaäquivalents mit gewebespezifischen Merkmalen und Barriereigenschaften wie in-vivo
- Eignung und Prävalidierung des Hemicornea Konstrukts für transcorneale Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen
- Vergleichbare Expressionsmuster von Effluxtransportern im Hemicornea Konstrukt und humanen Gewebe (Expression ist speziesspezifisch)
- Reduktion und Ersatz von Tierversuchen für pharmazeutisch-technologische Fragestellungen durch Entwicklung von DynaMiTES
  - Formulierungsentwicklung und Bioäquivalenz
  - Bewertung neuer Hilfsstoffe
    - Konservierungsstoffe
    - TJ Modulatoren zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit

# Acknowledgment

## TU Braunschweig

Matthias Hahne  
Gesa Grobe  
Jessica Verstraelen  
Nancy Kühn  
Christian Kölln  
Lucia Albrecht  
Anne Dolberg  
Nicole Beißner  
Daniel Saaber  
Dörte von Deylen

## UKE Hamburg

Dr. Michaela Zorn-Kruppa  
Prof. Dr. Johanna Brandner  
Dr. Stephan Linke

## Across Barriers GmbH

Dr. Eleonore Haltner-  
Ukomadu  
Gustavo Guzman



## Universität Düsseldorf

Prof. Dr. Gerd Geerling  
Prof. Dr. Stefan Schrader  
Dr. Maria Borrelli

## Universität Bremen

PD Dr. Maria Engelke

## TU Braunschweig

### Institut für Mikrotechnik

Prof. Dr. Andreas Dietzel  
Dipl. Ing. Thomas Lorenz  
Dipl. Ing. Kai Mattern

## Medizin. Hochschule

### Hannover

Prof. Dr. Rolf Winter



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung



VolkswagenStiftung



DAAD



Technische  
Universität  
Braunschweig

Braunschweig 10.02.2016 | S. Reichl



Institut für Pharmazeutische Technologie  
pharmazie in braunschweig