

# Human cornea constructs: in-vitro 3 D okular Modell

**Across Barriers GmbH**

Dr. Eleonore Haltner, Manuel Sacha



**across BARRIERS**

Intelligent Drug Profiling

## Überblick

- Kurzprofil Across Barriers
- Anatomie
  - Morphologie des Auges,
  - Morphologie der Hornhaut
- Relevanz des human Cornea Modell
  - Stand der Technik und Nachteile
  - Verfügbare Hornhaut Modelle
- Aufbau des Human Cornea Construct (HCC)
  - Pre-validierung des Modell (BMBF: 0315504C)
  - Ergebnisse
  - Fazit

## Across Barriers

wurde vom Prof. C.-M. Lehr und Dr. E. Haltner in 1998 gegründet

900 Arbeitsfläche

S2 laboren für biologische und radioaktive Arbeit

38 Mitarbeiter (Pharmazeuten, Chemiker, Biologen)

Zulassungen und Qualitätsstandards

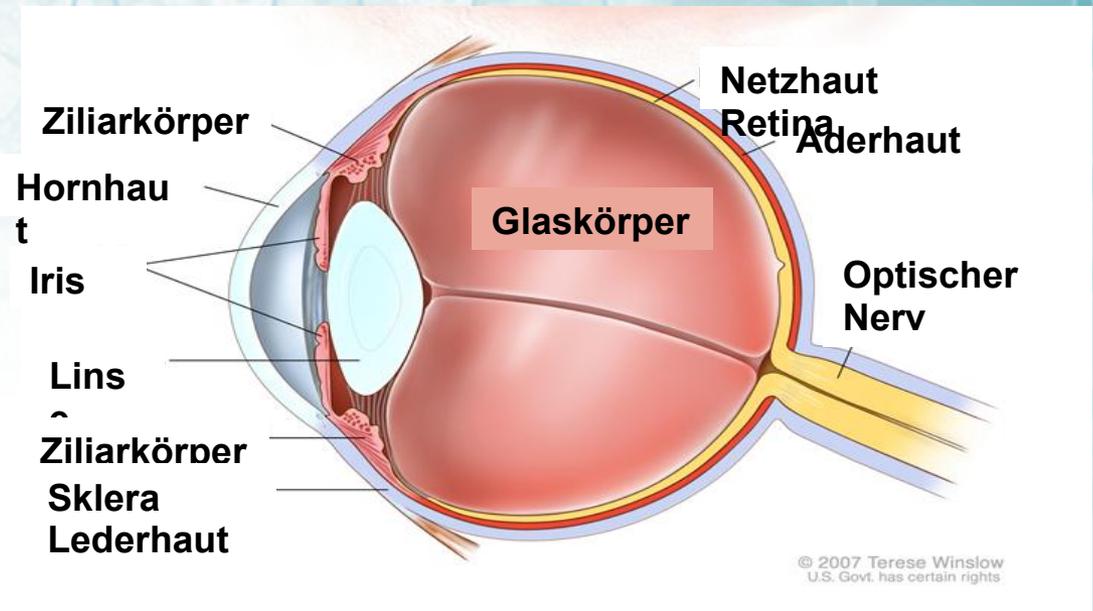
- **11/00** Zulassung für Radioaktive Arbeit
- **07/01** GLP Zulassung, 3 Kategorien (Good Laboratory Praxis)
- **07/02** GMP Zulassung
- **02/03** Narcotic Agents
- **09/09** FDA approved
- Selbständige Qualitätssicherheit



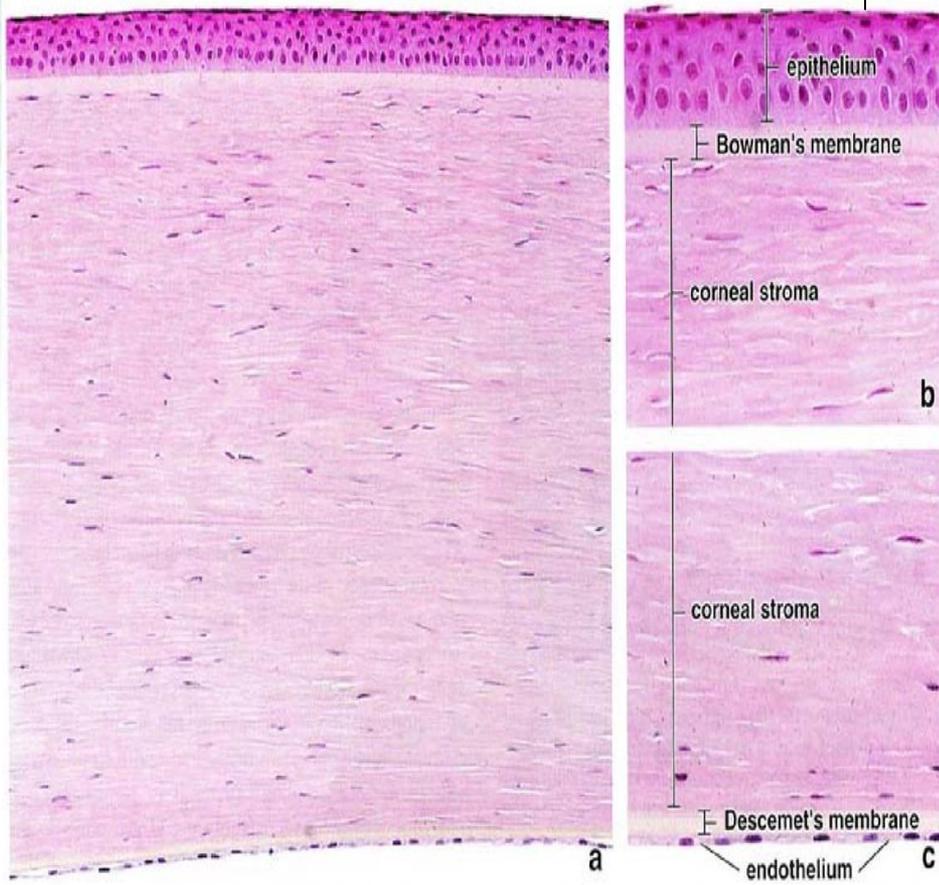
## Morphologie des Auges

### Zunahme an Augenkrankheiten

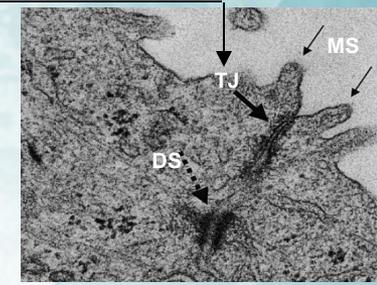
- Prognose: eine Erhöhung von 36 % bis 2020
- Zunahme an altersbedingten Erkrankungen z.B. Makuladegeneration (AMD)
- nicht überprüfte Wirksamkeit, hohe Nebenwirkungen von aktuellen Wirkstoffen
- Für die meisten ophthalmologischen Wirkstoffe fehlt heute eine fundierte Pharmakokinetik
- Notwendigkeit eines Testverfahren mit einer hohen Durchsatzrate im Arzneistoff Screening



# Hornhaut Morphologie



Surface cells  
Wing cells  
Basal cells



TEM figure Toropainen et al. 2001IOVS 12:2942-2948

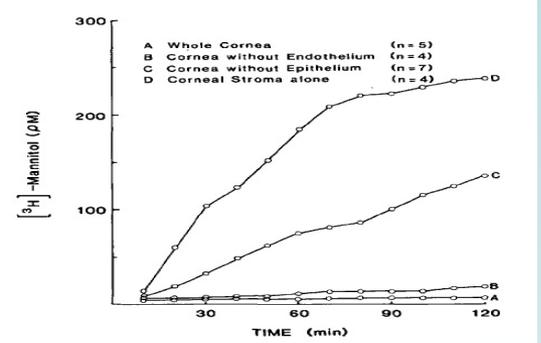
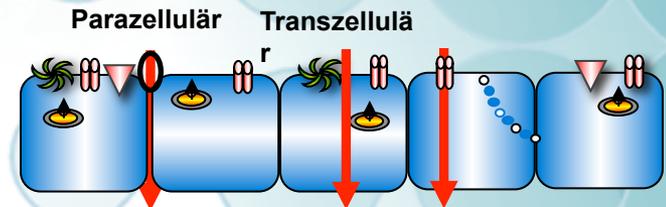


Figure Huang et al. JOPT 1989

## Aufbau des "human Cornea Construct" (HCC)

### Exzidierte Hornhäute von Versuchstieren

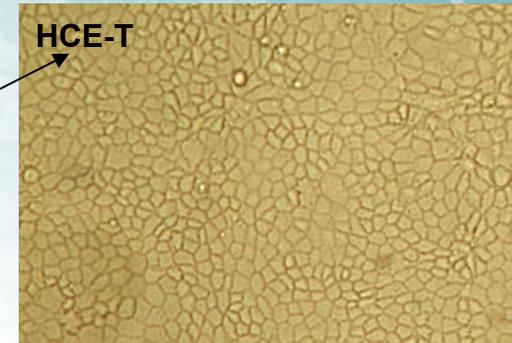
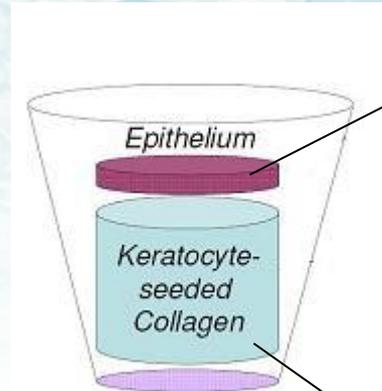
- kein humanes Modellsystem
- ethischer Aspekt, hohe Variabilität
- Schlechte Reproduzierbarkeit
- Schlechte Korrelation zum Mensch

### Monolayer epithelialer Zellkultur

- Kein physiologischer Vergleich zum menschlichen Auge, das aus mehreren Flüssigkeiten, Strukturen, Schichten mit verschiedenen physiologischen Eigenschaften besteht.

### Draize-Test (Irritationstest am Kaninchenauge)

- Verbot von Tierversuchen in der kosmetischen Industrie seit 2013
- Schlechte Reproduzierbarkeit und eingeschränkte Übertragbarkeit auf das menschliche Auge
- Ethischer Aspekt



**HCE-T**  
HCE-T (Araki- Sasaki et al. 1995)  
SV40-immortalisierte humane Epithelzelllinie

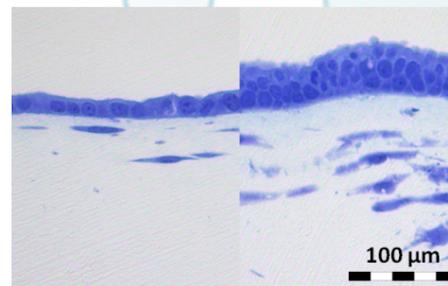
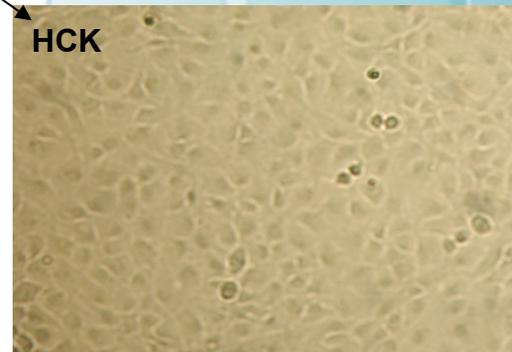


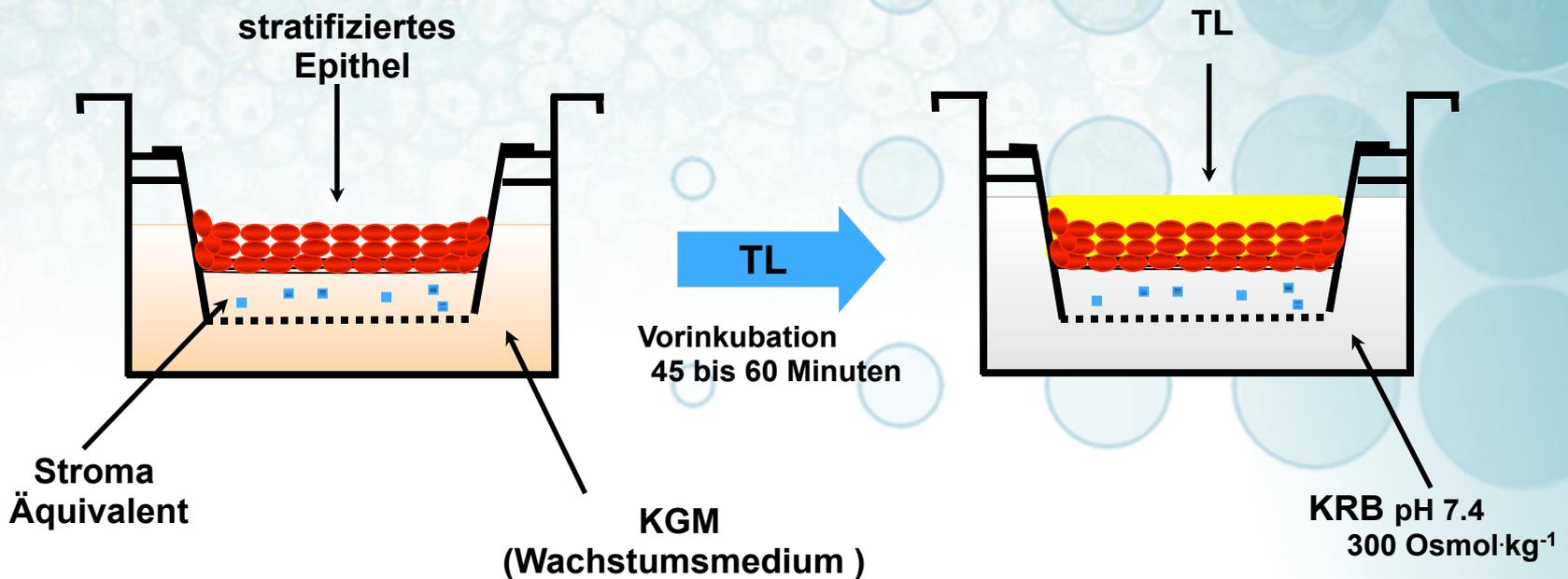
Figure Hahne et al. 2012 J Pharm Sci. 101 (8): 2976-88



**HCK**  
HCK (Zorn-Kruppa et al. 2005)  
SV40-immortalisierte humane Keratozyte

## Experimentelle Aufstellung

Toleranz und Permeationsversuche über 330 Minuten



Probenahme vom Akzeptor Kompartiment nach 0, 30, 90, 150, 210, 270 and 330 Minuten

## Prevalidierung des HCC Modell

### ● BMBF projekt: FKZ 0315504C

- **Augenreizung Gruppe:** Akademie für Tierschutz, Neubiberg; Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf; Universität Bremen
- **Permeabilität Gruppe:** Technische Universität Braunschweig Carolo-Wilhelmina (TUB); Across Barriers GmbH (ACB); Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)

● **Ausgewählte Marker:** Na-FLU (Hydrophilic), FD-4 (Macromolecule), Rhodamin B (Lipophilic), Propranolol (Lipophilic)

● **Ophthalmologische Arzneimittel:** Aciclovir (Antiviral), Dexamethasone (Steroid), Timolol (Beta-blocker), Bimatoprost (Prostaglandin analog)

**FD4:** Fluorescein isothiocyanate-dextran

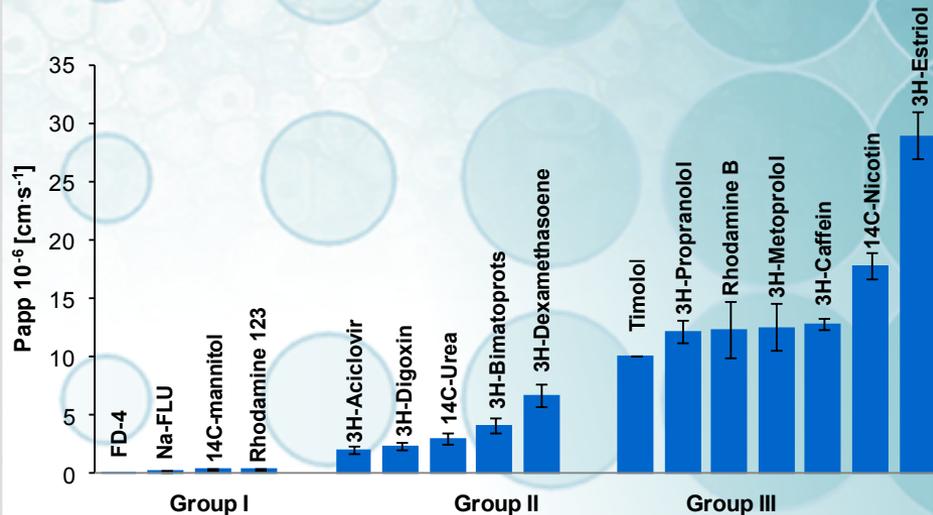
## Ergebnisse 1: Intra and inter-labor Reproduzierbarkeit

Substance	Intra-Laboratory Reproducibility TUB	Intra-Laboratory Reproducibility ACB	Intra-Laboratory Reproducibility UKE	Inter-Laboratory Reproducibility
FD-4	√	√	√	X
Na-FLU	√	√	√	√
Rhodamine B	√	√	√	√
Aciclovir	√	√	√	√
Bimatoprost	√	√	√	√
Dexametasone	√	√	√	√
Timolol	√	√	√	√

- **Intra-labor Reproduzierbarkeit:** 73-HC Chargen erfüllten die Äquivalenz Kriterien für intra-Labor Reproduzierbarkeit.
- **Inter-labor Reproduzierbarkeit :** 72 von 73 Chargen erfüllten die Äquivalenz Kriterien
  - FD-4 ergab die höchste Variabilität auf Kaninchen Cornea.

## Ergebnisse 2: Permeabilität von weiteren Marker und Wirkstoffe

Substance	$P_{app}$ [ $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ] $10^{-6}$	SD [ $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ] $10^{-6}$	RSD [%]	MW g/mol	Log P	N	# Cell batch
FD 4	0.041	0.018	43.63	4400	-2.00	12	2
Na-FLU	0.27	0.066	24.58	376	-1.52	32	6
$^{14}\text{C}$ -Mannitol	0.41	0.054	13.26	182	2.20	6	1
Rhodamine 123	0.40	0.078	18.41	380	1.13	28	5
$^3\text{H}$ -Aciclovir	2.05	0.34	16.70	225	1.56	12	2
$^3\text{H}$ -Digoxin	2.39	0.30	12.63	780	2.2	6	2
$^{14}\text{C}$ -Urea	3.01	0.50	16.67	60.05	-1.8	6	2
$^3\text{H}$ -Bimatoprost	4.18	0.63	15.01	415	3.20	12	2
$^3\text{H}$ -Dexamethasone	6.78	0.94	13.85	392	1.95	12	2
Timolol	10.21	0.42	4.09	316	1.91	12	2
propranolol	12.30	0.96	7.80	259	3.20	33	6
Rhodamine B	12.42	2.38	19.17	4.79	2.30	12	2
$^{14}\text{C}$ -Metoprolol	12.60	2.00	15.85	267	1.88	6	1
$^3\text{H}$ -Caffein	12.88	0.55	4.24	194	-0.50	6	2
$^{14}\text{C}$ -Nicotin	17.86	1.16	6.48	162	1.30	6	2
$^3\text{H}$ -Estriol	29.09	1.97	6.77	288	2.45	3	1



- Ranking according permeation coefficient:  $10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$
- Group I (low permeable < 1)
- Group II (middle permeable between < 1-10)
- Group III (high permeable > 10)

FD4: Fluorescein isothiocyanate-dextran

## Zusammenfassung

### **BMBF Projekt: 0315504C (Pre-Validierung)**

#### **In vitro modell Eigenschaften**

- Ähnliches Morphologie als die menschliche Hornhaut
- Geeignete Barriere zur Testung von Wirkstoffpermeabilität
- Das Modell kann Substanzen, in Zusammenhang auf deren physikochemischen Eigenschaften, zwischen Hoch und Geringpermeable klassifizieren
- Hohe Reproduzierbarkeit
- Hohe Genauigkeit der Messungen
- Ethisch unbedenklich
- Die Qualitätskontrollen sichern die Funktionalität des Modells ab

#### **Der Einsatzbereich des Modells sind Tests in der Entwicklung von**

- Ophthalmologischen Arzneimitteln
- Kosmetika
- Chemische Susbtanzen (REACH)
- Transcorneales Permeationsverhalten von Susbtanzen und Wirkstoffen
- Irritation- Test

## Perspektiven

### Weitere Toxizitätsversuche

- Quantifizierung der Freisetzung von proinflammatorische Zytokinen (for example, IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, PGE2)
- Vergleich der Daten mit weitere Testsysteme

### IVIVC

- Z.B. Draize Test
- Weitere Formulierungen (Linsen, Bioadhesive Formulierungen)

**Danke für Ihre Aufmerksamkeit!**



**Dr. Eleonore Haltner**  
Managing Director



**Manuel Sacha (M.Sc.)**  
Head of Business

**Across Barriers GmbH**  
[www.acrossbarriers.de](http://www.acrossbarriers.de)

Science Park 1  
66123 Saarbrücken, Germany  
[sales@acrossbarriers.de](mailto:sales@acrossbarriers.de)  
Telefon: +49 681 959 18 801  
Fax: +49 681 959 18 802

Development and Sales

[dr.haltner@acrossbarriers.de](mailto:dr.haltner@acrossbarriers.de) [m.sacha@acrossbarriers.de](mailto:m.sacha@acrossbarriers.de)

**ACROSS BARRIERS**

Intelligent Drug Profiling