

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

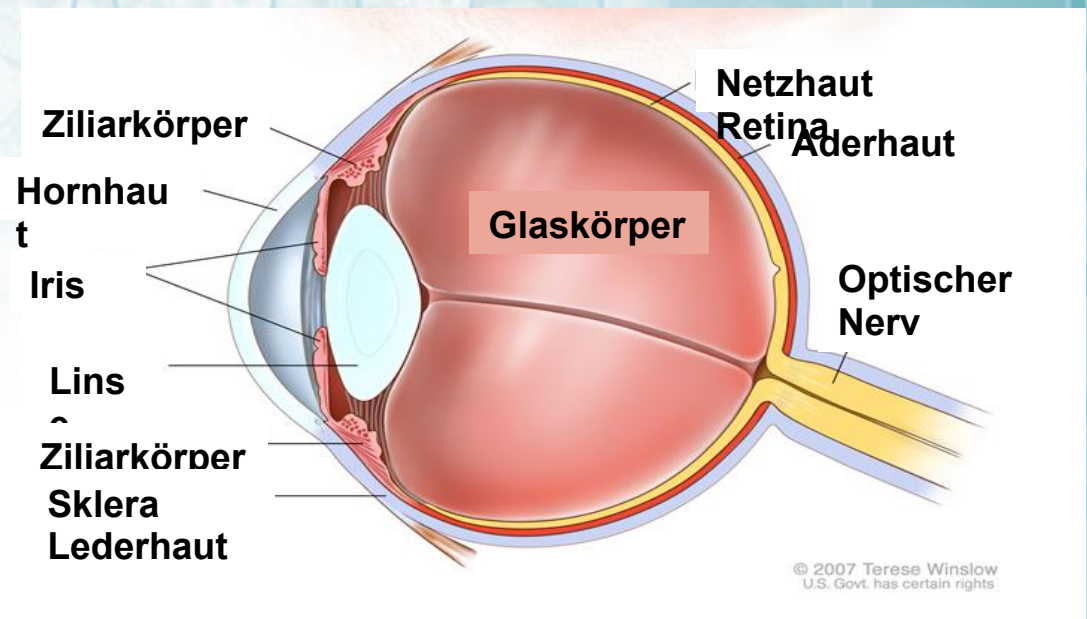
- **11/00** Zulassung für Radioaktive Arbeit
- **07/01** GLP Zulassung, 3 Kategorien (Good Laboratory Praxis)
- **07/02** GMP Zulassung
- **02/03** Narcotic Agents
- **09/09** FDA approved
- Selbständige Qualitätssicherheit



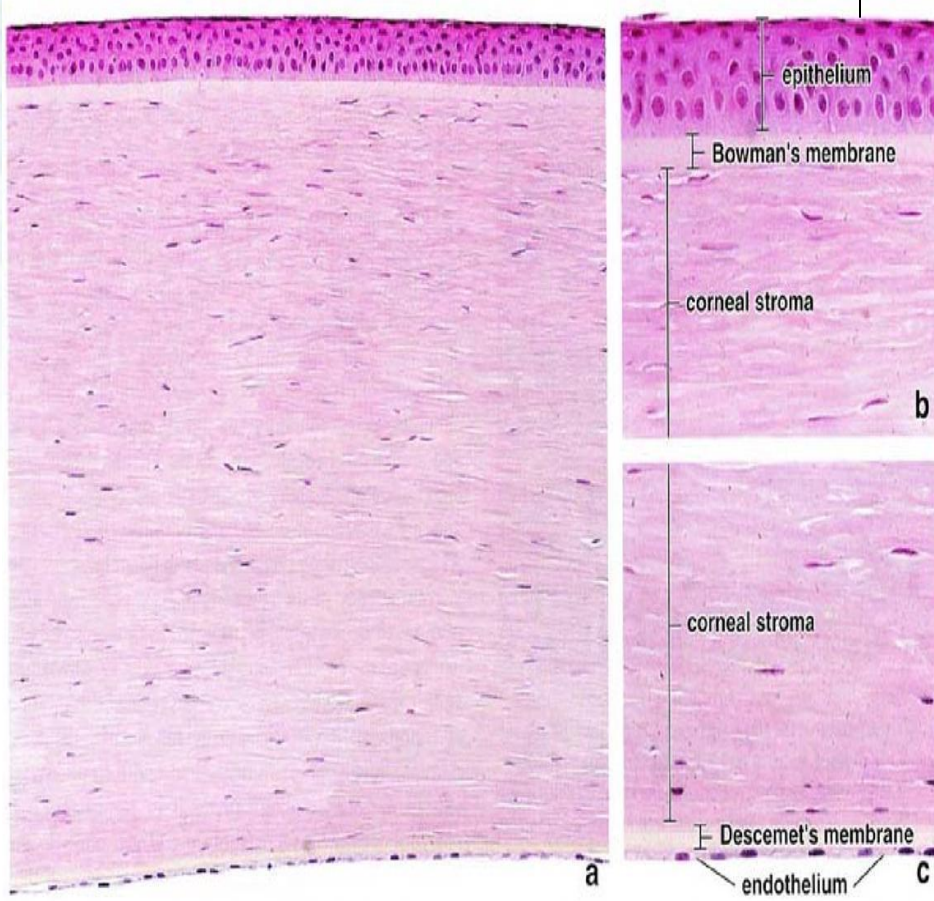
Morphologie des Auges

Zunahme an Augenkrankheiten

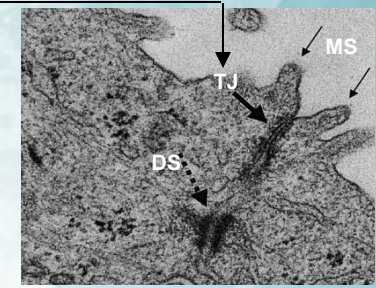
- Prognose: eine Erhöhung von 36 % bis 2020
- Zunahme an altersbedingten Erkrankungen z.B. Makuladegeneration (AMD)
- nicht überprüfte Wirksamkeit, hohe Nebenwirkungen von aktuellen Wirkstoffen
- Für die meisten ophthalmologischen Wirkstoffe fehlt heute eine fundierte Pharmakokinetik
- Notwendigkeit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

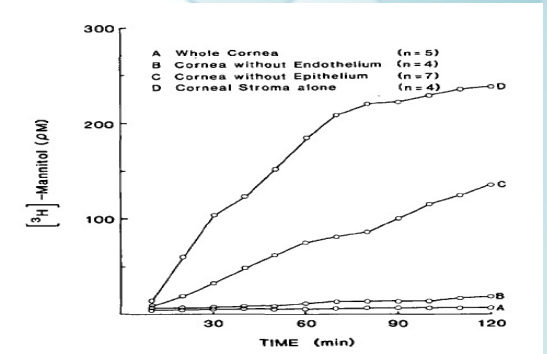
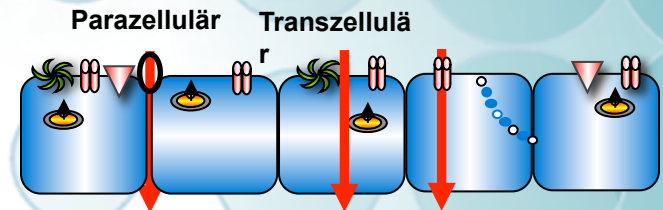


Figure Huang et al. JOPT 1989

Aufbau des "human Cornea Construct" (HCC)

Exzidierte Hornhäute von Versuchstieren

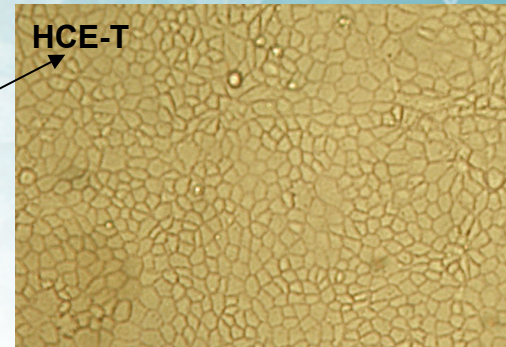
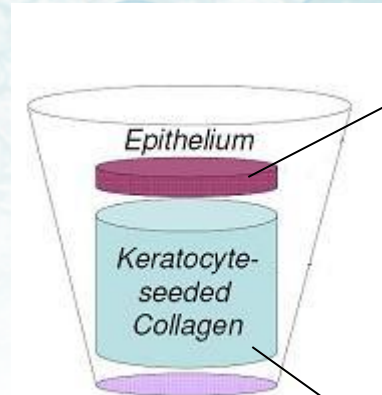
- kein humanes Modellsystem
- ethischer Aspekt, hohe Variabilität
- Schlechte Reproduzierbarkeit
- Schlechte Korrelation zum Mensch

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

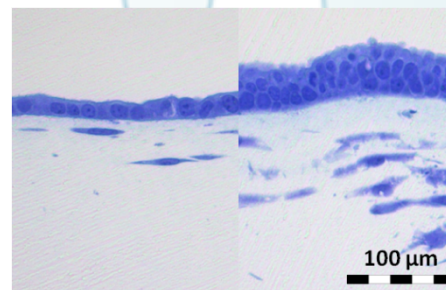
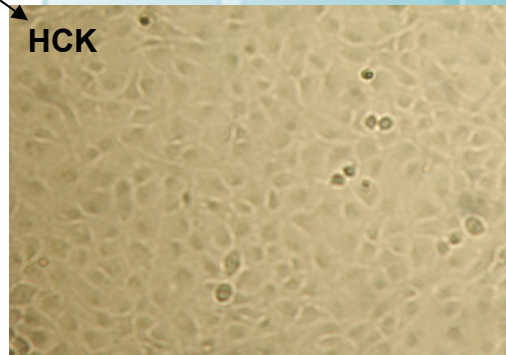


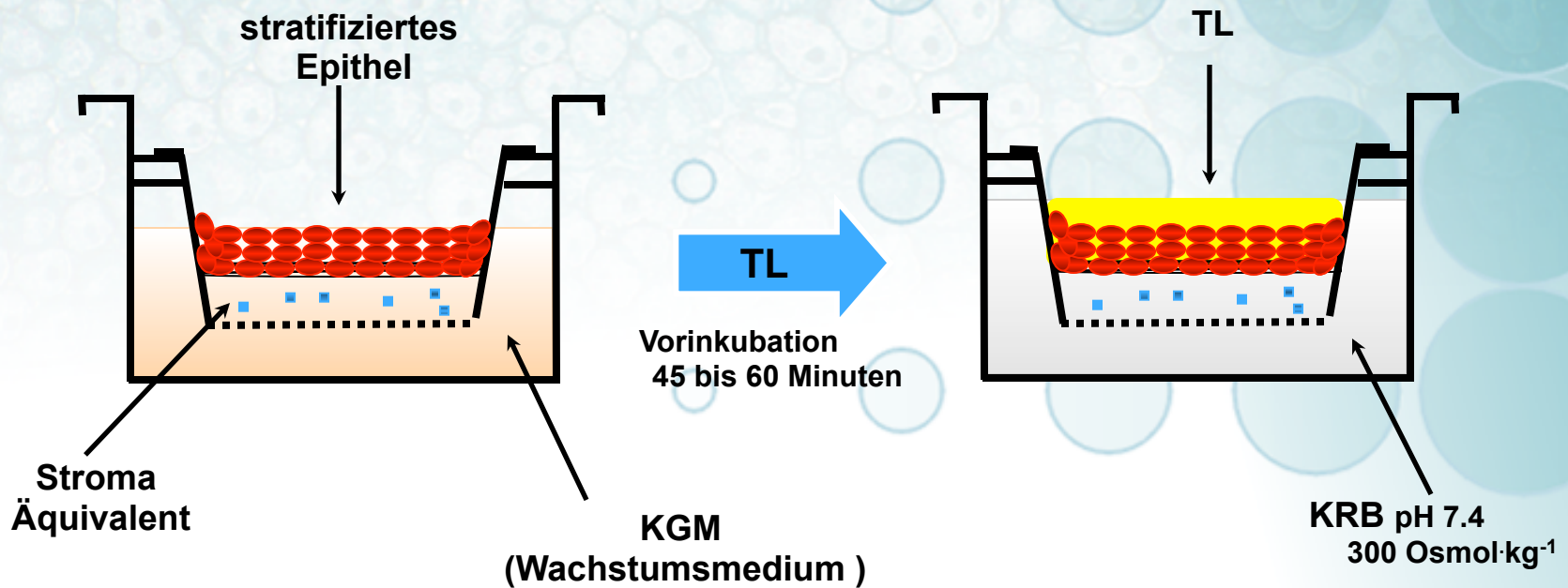
Figure Hahne et al. 2012 J Pharm Sci. 101 (8): 2976-88



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

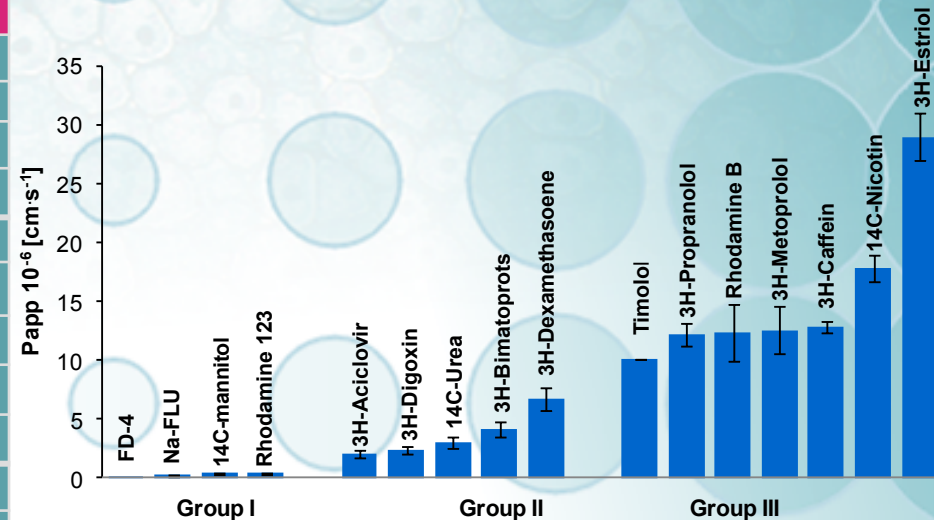
Ergebnisse 1: Intra and inter-labor Reproduzierbarkeit

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 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 H-Aciclovir	2.05	0.34	16.70	225	1.56	12	2
³ H-Digoxin	2.39	0.30	12.63	780	2.2	6	2
¹⁴ C-Urea	3.01	0.50	16.67	60.05	-1.8	6	2
³ H-Bimatoprost	4.18	0.63	15.01	415	3.20	12	2
³ 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 C-Metoprolol	12.60	2.00	15.85	267	1.88	6	1
³ H-Caffein	12.88	0.55	4.24	194	-0.50	6	2
¹⁴ C-Nicotin	17.86	1.16	6.48	162	1.30	6	2
³ H-Estriol	29.09	1.97	6.77	288	2.45	3	1



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 α , 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

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

Development and Sales

dr.haltner@acrossbarriers.de m.sacha@acrossbarriers.de

ACROSS BARRIERS

Intelligent Drug Profiling