

## *In vitro* Permeabilitätsuntersuchungen als Ersatz für Tier- und Humanstudien - welche Voraussetzungen müssen erfüllt sein?

Eleonore Haltner, Stefan Schmitz, Christiane Gindorf und Jörg Ruoff Across Barriers GmbH, D-Saarbrücken

### Zusammenfassung

Um die hohen Kosten und die langen Entwicklungszeiten bis zur Markteinführung eines Arzneimittels zu reduzieren, können zur Untersuchung der Permeabilität von Arzneistoffen neben anderen in vitro Methoden auch Zell- und Gewebekulturmodelle eingesetzt werden. Dabei sind allerdings vergleichbare Anforderungen an die Qualität der Methode zu stellen, wie sie im Rahmen von klinischen Untersuchungen und Tierstudien üblich sind.

Das Caco-2 Modell ist in Forschung und Industrie ebenso wie im Drug Discovery Bereich etabliert und anerkannt. Die mangelnde Standardisierung der Arbeitsmethoden führt allerdings zu einer hohen Variation der mit Hilfe dieses Modells erhobenen Daten. Am Beispiel Caco-2 wird dargestellt, wie ein Zellkulturmodell zur Untersuchung der Permeabilität von Arzneistoffen qualifiziert werden kann. Neben der Charakterisierung morphologischer Parameter gehören dazu die funktionelle Beurteilung sowie die periodische Kontrolle der Permeabilitätseigenschaften. Bedingung für die Vergleichbarkeit von Permeabilitätsdaten sowie der Prädiktion von in vivo Permeabilitäten ist ferner eine Klassifizierung der in vitro Permeabilitäten im Sinne des von der FDA vorgeschlagenen Biopharmaceutics Classification System (BCS).

Summary: In vitro permeability studies as substitute for in vivo studies - which requirements have to be met? In order to reduce costs and shorten time-to-market, the permeability of drug substances can be characterized by in vitro techniques including the use of cell and tissue models. It is required to apply appropriate quality standards similar to those used in animal or clinical studies. The Caco-2 cell model is a well-established and recognized in vitro technique in research, industry and in the drug discovery sector. However, the lack of standardized operating is reflected in the heterogeneity of the data acquired using this model. Using the Caco-2 cell model as an example, this paper demonstrates how to test the suitability of a cell culture model for conducting drug permeability studies. The procedures involve not only the characterization of cell morphology but also functional assessment of the model and the periodic testing of monolayer permeability. Both the useful comparison of permeability data and the reliable prediction of in vivo permeability require prior classification of the in vitro permeability in accordance with the FDA's Biopharmaceutics Classification System (BCS).

Keywords: drug absorption, gastrointestinal, bioavailability, validation, qualification

### 1 Einleitung und Fragestellung

Um die hohen Sicherheitsstandards der pharmazeutischen Industrie und der Zulassungsbehörden zu erfüllen, werden an Alternativmethoden für Tier- und Humanstudien hohe Anforderungen gestellt. Grundlegend sind dabei internationale Richtlinien zur Qualitätssicherung aus den Bereichen Good Laboratory Practice (GLP, www.glpguru.com/index.shtml)oder Good Manufacturing Practice (GMP). Aus diesen leiten sich auch die sogenannten Good Cell Culture Practice (GCCP) Empfehlungen ab, die beim 3. Weltkongress zur Entwicklung von Alternativmethoden in Bologna vorgestellt worden sind und momentan weiter ausgearbeitet werden.

Angelehnt an die ICH-Vorgaben (International Conference on Harmonization, www.ifpma.org/ich1.html) zur Methodenvalidierung wurden Selektivität, Reproduzierbarkeit und Robustheit der Permeabilitäsbestimmung an Caco-2 Zellmonolayern überprüft. Dazu wurden repräsentative Markersubstanzen ausgewählt, welche niedrig oder hoch permeable Substanzen beziehungsweise passiv oder aktiv transportierte Substanzen darstellen. Die Robustheit der Methode wurde anhand des Einflusses organischer Lösungsmittel oder BSA auf die Permeabilität untersucht. Da sich die Permeabilitätskoeffizienten von schnell zu langsam transportierten Substanzen zum Teil nur um den Faktor 5-10 unterscheiden, müssen auch an die Präzision der Methode hohe Anforderungen gestellt werden. Eine mangelnde Standardisierung von Untersuchungstechniken, aber auch die Variabilität der polyklonalen Caco-2 Zelllinie erschweren den direkten Vergleich von Permeabilitätsdaten aus verschiedenen Laboratorien. Um einen solchen Vergleich zu ermöglichen, muß die Permeabilität von Wirkstoffen in Relation zu der von bekannten Modellsubstanzen beurteilt werden. Das von der FDA vorgeschlagene Biopharmaceutics Classification System (BCS) erlaubt die Klassifizierung von Arzneistoffen hinsichtlich der in vitro Permeabilität, stellt aber gleichzeitig hohe Anforderungen an das verwendete Testsystem. Die im folgenden beschriebenen Maßnahmen zur Sicherstellung der Systemeignung (system suitability) stellen eine wesentliche

Grundlage für die behördliche Akzeptanz der erzeugten Daten dar.

### 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), nicht-essentielle Aminosäuren (NEA), Trypsin-EDTA-Lösung und Gentamicinsulfat wurden von Biochrom KG (D-Berlin) geliefert. Atenolol, Propranolol, Metoprolol Fluorescein, Rhodamin 123, Dimethylsulfoxid (DMSO), Bromochloroindolylphosphat, Tetranitrobluetetrazolium, Glutaraldehyd, Osmiumtetraoxid, Dimethylformamid und Hämatoxylin wurden von Sigma Chemicals (D-Deisenhofen), fötales Kälberserum (FKS) von Greiner Labortechnik (D-Frickenhausen) bezogen. Salze zum Ansetzen der Pufferlösungen lieferten Merck (D-Darmstadt) oder Fluka (D-Neu-Ulm). Es wurden Zellkulturflaschen (75 cm2) und Transwellplatten der Firma Costar (D-Wiesbaden) verwendet. Alle anderen Einmalartikel für die Zellkultur wurden von Biochrom KG (D-Berlin) bezogen. Die Phasenkontrastaufnahmen von Caco-2 Zellen wurden in Kulturmedium mit einem Olympus CK 2 Mikroskop (Olympus Optical Company GmbH, D-Hamburg), ausgerüstet mit einer Fotoeinrichtung Wild MPS 46/52 (Fa. Wild, Heerbrugg, Schweiz), aufgenommen.

### 2.2 Zellkultur

Die verwendeten Caco-2 Zellen wurden freundlicherweise vom Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie (Saarbrücken) zur Verfügung gestellt. Die Caco-2 Zellen wurden in DMEM, (pH 7,2-7,4), welches mit 10% FKS, 1% NEA und 50 µg·mL-1 Gentamicin supplementiert war, bei 37°C, 5% CO, und 90% relativer Luftfeuchte kultiviert. Zur Vermehrung der Zellen erfolgte die Aussaat in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit einer Dichte von 106 Zellen pro Flasche. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Die Zellen wurden einmal pro Woche passagiert. Für Transportexperimente wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA Lösung geerntet und mit einer Dichte von 6·10<sup>4</sup> Zellen·cm<sup>-2</sup> auf Transwell®-Filtereinsätze ausgesät. Die Filter bestehen aus Polyester und haben eine Fläche von 1,13 cm<sup>2</sup> sowie einen Porendurchmesser von 0,4 µm. Für die

82

Versuche wurden Caco-2 Monolayer der Passagen 11-46 verwendet. Die verwendeten Zellen repräsentieren die parentale Caco-2 Zellinie, welche auch bei Zellkultursammlungen wie ATCC oder DSZM erhältlich ist. Die Passagennummer gibt die Anzahl der Subkultivierungen nach dem Erhalt der Zellen an und ist demnach kein absoluter Wert. Zur Durchführung der Versuche wurden Zellen mit der Passagennummer 9 frisch aufgetaut und vor Beginn der Permeabilitätsuntersuchungen zweimal in Zellkulturflaschen subkultiviert.

### 2.3 Morphologische Charakterisierung

### 2.3.1 Lichtmikroskopie

Für die Semi-Dünnschnitte wurden Caco-2 Zellen auf Polyesterfiltern zur Konfluenz gezüchtet. Der Puffer im apikalen und basolateralen Kompartiment wurde entfernt und die Monolayer für eine Stunde mit 2% Glutaraldehyd in Sörensen-Puffer (pH 7,4) fixiert. Nach einem weiteren Fixierungsschritt mit 1% Osmiumtetraoxid in Phosphatpuffer (pH 7,3) nach Millonig (1961), wurden die Zellen mit Ethanol dehydriert und in Araldit 502 (Polysciences, Paesel, Frankfurt) eingebettet. Die Färbung erfolgte mit Methylenblau und Azur II nach Richardson (1960).

### 2.3.2 Elektronenmikroskopie

Für transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen wurden Ultradünnschnitte der fixierten Präparate hergestellt. Die Ultradünnschnitte wurden mit Bleizitrat und Uranylazetat kontrastiert und in einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM10 CR, Oberkochen) des Instituts für Anatomie der Universität des Saarlandes, Homburg bei 60kV untersucht. Zellmonolayer für die Rasterelektronenmikroskopie wurden auf Glasdeckgläsern (1 cm Durchmesser) gezüchtet. Die Fixierung mit Glutaraldehyd und Osmiumtetraoxid erfolgte wie oben beschrieben. Danach wurden die Zellen mit 1% Tanninsäure und anschließend mit 1% Uranylazetat fixiert. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden äthanolischen Reihe bis 100%. Die Kritische-Punkt-Trocknung wurde mit CO, durchgeführt. Die Präparate wurden mit einer 2-5 nm dikken Goldschicht bedampft und in einem CamScan S2 bei 10-20 kV im Institut für Anatomie der Universität des Saarlandes, Homburg bei 60kV untersucht untersucht.

### 2.3.3 Alkalische Phosphatase

Caco-2 Zellen wurden auf Glasdeckgläschen (10 mm Durchmesser, Assistent Hecht, Sondheim) ausgesät. Zur Herstellung der Präparate wurden die Zellen mit Phospate Buffered Saline (PBS, pH 7,4) zweimal gewaschen und anschließend bei 4°C, 30 Minuten mit Äthanol fixiert. Die Färbelösung, bestehend aus 1,5 mg Bromochloroindolylphosphat in 200 µl Trispuffer (20 mM, pH 8,9 - 9,2) und 3,5 mg Tetranitrobluetetrazolium in 200 µl Dimethylformamid (DMF), wurde unmittelbar bevor sie eingesetzt wurde, durch Mischen der beiden Komponenten in 5 ml Tris-Puffer hergestellt. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS, einmal mit Tris-Puffer gewaschen und anschließend mit der Färbelösung für 10-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbentwicklung wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Gilles für 2 Minuten erfolgte, nachdem die Zellen dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen worden waren. Bevor die Deckgläser mit Aqua Polymount (Polysciences, Paesel, Frankfurt) auf Glasobjektträger aufgebracht wurden, wurde überschüssiges Hämatoxylin durch dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser und einem 10 minütigen Waschschritt mit Leitungswasser entfernt. Die Beobachtung erfolgte mit einem Auflichtmikroskop Olympus BH2 (Olympus Optical Company GmbH, D-Hamburg) ausgerüstet mit einem Wild MPS 46/52 Fotoautomat (Fa. Wild, CH-Heerbrugg).

### 2.4 Monitoring des Zellwachstums

Neben einer lichtmikroskopischen Überwachung des Zellwachstums wurde die Ausbildung konfluenter Monolayer mit funktionellen *tight junctions* während des Zellwachstums vor jedem Mediumwechsel über die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) kontrolliert. Hierfür wurde die EVOM" Apparatur mit einer STX2-Elektrode (*World Precision Instruments*, Sarasota, USA) eingesetzt.

### 2.5 Transportversuche

Die Transportstudien wurden in Transwell<sup>®</sup>-Platten mit jeweils 12 Filtereinsätzen durchgeführt. Das Kulturmedium im





Donor- und Akzeptor-Kompartiment wurde entfernt und durch 500 µL (apikal) bzw. 1500 µL (basolateral) physiologischen Krebs-Ringer Puffer ersetzt. Nach einer einstündigen Äquilibrierung der Zellen wurde der Krebs-Ringer Puffer im Donorkompartiment durch eine Lösung der jeweiligen Markersubstanz ersetzt. Alle Markersubstanzen wurden in Krebs-Ringer Puffer (pH 7,2-7,4) gelöst. Zu definierten Zeiten wurden Proben von jeweils 100 µL aus dem Akzeptorkompartiment entnommen und das entnommene Volumen durch Krebs-Ringer Puffer ersetzt. Der apparente Permeationskoeffizient (P<sub>app</sub>  $[cm \cdot s^{-1}]$ ) wurde mit der Gleichung P<sub>app</sub> =  $dQ/dt \cdot 1/m_0 \cdot 1/A \cdot V_{Donor}$  berechnet. Der Quotient dQ/dt beschreibt die Steigung der Transportkurve, die sich für den jeweiligen Marker aus der Auftragung des Massentransportes dQ in das Akzeptorkompartiment gegen die Zeit ergibt. Der Ausdruck V<sub>Donor</sub> (Donorvolumen)·dQ/dt beschreibt den "steady state flux" in µg·ml-1 pro Zeiteinheit. A (1,13 cm<sup>2</sup>) ist die Fläche des exponierten Zellmonolavers und m. die Ausgangsmasse (µg) der Markersubstanz im Donor. Im Rahmen von Transportstudien zur Identifikation aktiver Transportkomponenten wurde der bidirektionale Transport in Richtung apikal nach basolateral (ab) und umgekehrt (ba) untersucht.

### 2.6 Qualitätsmonitoring der Caco-2 Zellmonolayer

Die Integrität der Zellmonolayer sowie die Expression von Effluxproteinen wurde für jede verwendete Zellcharge durch die Bestimmung der Permeabilität zweier Markersubstanzen überprüft. Die Experimente wurden wie unter 2.5 beschrieben durchgeführt. Dabei diente Fluorescein (10 µg·ml-1) zum Monitoring des parazellulären Transportes (ab), mit Propranolol (10 µg·ml-1) wurde der transzelluläre Transport (ab) überprüft. Um eine Konformität der unterschiedlichen Zellchargen (Passagen) zu gewährleisten, wurden diese Permeabilitätsstudien über 38 Wochen durchgeführt. Anhand der gewonnenen Daten können Akzeptanzkriterien festgelegt werden, welche zur Beurteilung von Zellchargen bezüglich ihrer absorptiven Eigenschaften herangezogen werden können. So wurde für den apparenten Permeationskoeffizienten des "low permeability" Markers Fuorescein ein oberer Grenzwert von  $1 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ und für den *"high permeability"* Marker Propranolol ein unterer Grenzwert von  $5 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  festgelegt (siehe Abbildung 3). Die angegebenen Grenzwerte sind laborspezifisch.

### 2.7 Selektivität / Spezifität der Methode zur Permeabilitätbestimmung

Um die Selektivität des Caco-2 Modells zu überprüfen, ermittelten wir die Transportgeschwindigkeiten für verschiedene parazellulär und transzellulär transportierte Markersubstanzen. Als parazelluläre Marker wurden Fluorescein (10 µg·ml<sup>-1</sup>) und Atenolol (80 µg·ml-1), als transzelluläre Marker Propranolol (10 µg·ml-1) und Metoprolol (10 µg·ml<sup>-1</sup>) eingesetzt. Des weiteren wurden der Transport von Fluorescein und Rhodamin 123 (3.8 µg·ml-1), welches ein Substrat für die Effluxpumpe P-Glykoprotein darstellt (Hunter et al., 1993: Sakei et al., 1994), in beiden Transportrichtungen verglichen. Die Transportuntersuchungen wurden wie unter 2.5 beschrieben durchgeführt.

### 2.8 Robustheit der Methode zur Permeabilitätbestimmung

Die richtige Interpretation von Ergebnissen setzt die Kenntnis und Abschätzbarkeit verschiedener Einflußgrößen auf den Transport von Arzneistoffen voraus. Mittels Transportstudien (vgl. 2.5) untersuchten wir exemplarisch den Einfluß zweier potentieller Störgrößen auf das Testsystem. Zum einen wurde die Wirkung von Lösungsmitteln (hier DMSO) auf die Integrität von Caco-2 Zellmonolayern untersucht. Dazu wurden dem Testmedium im apikalen Kompartiment verschiedene Konzentrationen an DMSO sowie 10 µg·ml<sup>-1</sup> des Integritätsmarkers Fluorescein zugesetzt. Die Fluoresceindurchlässigkeit der unterschiedlich behandelten Monolayer wurde verglichen und anhand der zuvor festgelegten Akzeptanzkriterien beurteilt. Zum anderen wurde der Einfluß von verschiedenen Konzentrationen an Rinderserumalbumin (BSA) im apikalen Testmedium auf die Transportgeschwindigkeit von Markersubstanzen untersucht, für die eine unterschiedliche Affinität zu Serumproteinen bekannt ist.

### 2.9 Analytik

Propranolol und Metoprolol wurden mittels HPLC (*Waters Alliance<sup>TM</sup>*, *Waters Corporation* USA-Milford) vermessen. Die Fluorescein- und Rhodaminproben wurden durch Fluoreszenzmessung (Wallac Victor<sup>2</sup>; *Microplate Fluorescence Reader*, Wallac D-Freiburg; Ex: 485 nm, Em: 535 nm, *lamp intensity* 5000, *aperture setting: damp*) analysiert.

### 2.10 Software

Die Analysengeräte waren mit einem PC verbunden, welcher die Daten mit Hilfe einer proprietären Software dokumentiert und in das MS Excel 5.0 Format konvertiert. Die Daten wurden mit Hilfe eines auf Microsoft Excel basierenden Auswerteschemas verarbeitet. Die graphischen Präsentationen wurden mit Microcal Origin 6.0 erstellt.

### **3** Ergebnisse

### 3.1 Zellmorphologie

Nach Aussaat der Caco-2 Zellen auf Gewebekulturplatten oder Filtern, sind die meisten Zellen nach 12 Stunden adhäriert.



Abb. 1: Links: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines "domes" einer 18 Tage alten Caco-2 Kultur. Rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme von Caco-2 Zellen nach alkalischer Phosphatase-Hämatoxylin Doppelfärbung (Vergrößerung 400 x).



Abb. 2: Verlauf des TEER während der Anzucht der Caco-2 Zellmonolayer (verschiedene Passagen) über 19 Tage. Die Werte stellen Mittelwerte des TEER ( $\pm$  SD) von jeweils 12 Monolayern einer Transwell<sup>®</sup> Platte dar.

Nach vier Tagen in Kultur haben sie sich schon stark vermehrt und bilden zusammenhängende Inseln. Mit beginnender Konfluenz beginnt die Polarisation der Caco-2 Zellen und die Ausbildung der Mikrovilli (Hidalgo et al., 1989). Wenn die Zellen Konfluenz erreicht haben, bilden sie flüssigkeitsgefüllte Halbzysten, die sog. "domes" aus. Die rasterelektronische Aufnahme eines "domes" ist in Abbildung 2 (links) zu sehen. Ein weiteres Differenzierungsmerkmal für Caco-2 Zellen ist die Expression von Brush Border Membran Enzymen, wie der Alkalischen Phosphatase (Pinto et al., 1983; Howell et al., 1992; Brewis et al., 1993). Diese wurde mit Hilfe der Tetrazoliumsalzmethode nachgewiesen (Romeis, 1989). Die Zellkerne der Caco-2 Zellen wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Sie sind im Präparat blau zu erkennen. Die dunklen Zellen in der Aufnahme sind alkalische Phosphatase positiv (Abbildung 1, rechts).

### 3.2 Monitoring des Zellwachstums

Das Wachstum der Caco-2 Zellen und die Ausbildung einer dichten Zellbarriere kann über die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes verfolgt werden. Wenn die Monolayer konfluent sind (Tag 4-6) wird der Anstieg des TEER durch die weitere Differenzierung der Zellen (Madara et al., 1987) und die Ausbildung funktioneller dichter Zellkontakte (tight junctions) bestimmt. Der linke Teil der Abbildung 2 zeigt den Verlauf des TEER während der Anzucht von unterschiedlicher Zellpassagen (p22, p28-p32). Rechts ist der Verlauf des TEER bei der Anzucht von Caco-2 Zellen derselben Passage auf parallel kultivierten Zellkulturplatten dargestellt.

Der TEER stieg während der Anzucht der Caco-2 Monolayer der Zellpassagen 19, 22 und 28-32 kontinuierlich an. Maximale TEER-Werte wurden typischerweise am Tag 19 erreicht. Für die Zellpassagen 22, 28 und 29 wurden die TEER-Wer-



Abb. 3: Apparenter Permeationskoeffizient von Fluorescein (parazellulär) und Propranolol (transzellulär) über 38 Wochen (n= $3 \pm SD$ ).

te bis zum Tag 21 nach der Aussaat bestimmt. Hier ist ein Abknicken der TEER-Kurve nach dem Tag 19 zu erkennen. Dies stimmt mit unabhängigen Versuchen überein, welche zeigen, dass sich die TEER-Werte nach Erreichen eines Maximums am Tag 19-21 einem konstanten Wert annähern, welcher mindestens bis zum Tag 30 erhalten bleibt (Daten nicht dargestellt). Die Ergebnisse zeigen, dass der TEER während der Anzucht sowohl für parallel kultivierte Zellen als auch für verschiedene Zellpassagen, welche zu unterschiedlichen Zeiten gezüchtet wurden, einen reproduzierbaren Verlauf zeigt. Die Konstanz des TEER ist ein Merkmal für die Vergleichbarkeit der Qualität unterschiedlicher Monolayer und Zellpassagen.

# 3.3 Monitoring der Permeabilität von Markersubstanzen an Caco-2 Zellmonolayern

Um die Konformität sukzessiver Zellpassagen zu überprüfen, wurde ihre Permeabilität für die Markersubstanzen Fluorescein für den parazellulären Transport und Propranolol für den transzellulären Transport über 38 Wochen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

Der apparente Permeationskoeffizient für Fluorescein lag stets unter  $1\cdot10^{-6}$  cm·s<sup>-1</sup>. Im Vergleich dazu liegt der Fluoresceinflux über einen zellfreien Filter bei  $1,4\cdot10^{-5}$  cm<sup>-1</sup>, also um mehr als den Faktor 14 höher als der Transort über einen Filter plus Zellmonolayer. Caco-2 Zellen bieten somit ein funktionelles, reproduzierbares Modell zur Untersuchung von Transportvorgängen über die gastrointestinale Barriere. Aus kontinuierlich erhobenen Permeabilitätsdaten lassen sich systemspezifische Akzeptanzkriterien ableiten, nach denen sich einzelne Zellchargen bezüglich ihrer Güte für Permeationsstudien beurteilen lassen.

Für den apparenten Permeationskoeffizienten des "*low permeability*" Markers Fuorescein wurde ein oberer Grenzwert von 1·10<sup>-6</sup> cm·s<sup>-1</sup> und für den "*high permeability*" Marker Propranolol ein unterer Grenzwert von 5·10<sup>-6</sup> cm·s<sup>-1</sup> festgelegt. Die Festlegung solcher Grenzwerte ist laborspezifisch und kann nur bedingt auf das Caco-2 Modell eines anderen Labors übertragen werden.

#### 3.4 Selektivität

Die Selektivität eines *in vitro* Modells ermöglicht eine Unterteilung in hoch und



Abb. 4: Selektivität des Caco-2 Modells bezüglich der Permeabilität (passiver Transport) von Markersubstanzen. Die dargestellten apparenten Permeationskoeffizienten wurden an drei verschiedenen Zellpassagen für jeweils 3 Monolayer (n=3  $\pm$  SD) bestimmt.

niedrig permeable Substanzen und ist somit Voraussetzung für die Zuordnung von Arzneistoffen zu Permeabilitätsklassen im Sinne des Biopharmaceutics Classification System (BCS, Amidon et al., 1995; Dressman et al., 2000). Die Geschwindigkeit, mit der ein Arzneistoff eine biologische Barriere passiert, spielt eine wichtige Rolle für seine Bioverfügbarkeit. Eine passive Diffusion ist im wesentlichen von dem bevorzugten Transportweg (parzellulär oder transzellulär) abhängig. Darüberhinaus kann die Aktivität von Carrierproteinen den Transport (apikal-basolateral) beschleunigen (aktive Absorption) oder verlangsamen (aktiver Efflux). Abbildung 4 zeigt exemplarisch die Permeabilitätsbestimmung für jeweils zwei Marker, welche den Zellmonolayer über den (typi-



Abb. 5: Selektivität des Caco-2 Modells bezüglich der Permeabilität (Einfluß aktiver Transport-mechanismen) von Markersubstanzen. Die dargestellten apparenten Permeationskoeffizienten für Rhodamin 123 und Fluorescein wurden an unterschiedlichen Zellpassagen (n=3  $\pm$  SD bzw.n=6  $\pm$  SD) bestimmt.

scherweise langsamen) parazellulären Transportweg bzw. den (typischerweise schnellen) transzellulären Transportweg passieren. Abbildung 6 vergleicht den bidirektionalen Transport der beiden Marker Rhodamin 123 (Pgp Substrat) und Fluorescein (kein Pgp-Substrat).

Es zeigt sich, dass die parazellulär transportierten Marker Fluorescein und Atenolol den Monolayer sehr langsam passieren ( $P_{app}$  (Fluorescein)= 2,9 - 4,3 · 10<sup>-7</sup> cm·s<sup>-1</sup>,  $P_{app}$  (Atenolol) = 4,5 - 5,2 · 10<sup>-7</sup> cm·s<sup>-1</sup>), während der Transport der transzellulär transportierten Substanzen durchschnittlich um den Faktor 30 höher ist ( $P_{app}$  (Propranolol)= 0,9 - 1,6 · 10<sup>-5</sup> cm·s<sup>-1</sup>,  $P_{app}$  (Metoprolol) = 1,0 - 1,6 · 10<sup>-5</sup> cm·s<sup>-1</sup>). Das Caco-2 Modell erlaubt demnach eine selektive Identifikation von ,*high permeability*" und *"low permeability*" Substanzen.

Die Transportgeschwindigkeit des Pgp-Substrates Rhodamin 123 ist sehr stark von der Transportrichtung abhängig. In Richtung basolateral-apikal ist der Transport um den Faktor 40 schneller als der Transport in die umgekehrte Richtung. Dieser Unterschied ist auf eine aktive Rhodaminsekretion durch das in der apikalen Zellmembran lokalisierte P-Glykoprotein zurückzuführen. Auf den Transport von Fluorescein hat das P-Glykoprotein dagegen keinen Einfluß. Der aktive Rhodaminefflux läßt sich durch den P-Glykoprotein Inhibitor Verapamil sehr stark reduzieren, so dass sich die Transportgeschwindigkeiten für beide Richtungen angleichen.

### 3.5 Robustheit

Um die Resultate von Permeabilitätsstudien korrekt interpretieren zu können, muß man für den Versuchsaufbau oder die Fragestellung relevante Einflußgrößen auf das Testsystem kennen und hewerten. Beispielsweise können schlecht wasserlösliche Substanzen die Verwendung eines organischen Lösungsmittels notwendig machen. Ein solcher Versuchsansatz ist aber nur dann sinnvoll, wenn der Einfluß des Lösungsmittels auf die Integrität der Zellmonolayer bekannt ist und die maximal zulässige Lösungsmittelkonzentration ermittelt wurde. In Abbildung 6 ist der Einfluß von verschiedenen Konzentrationen an DMSO auf die Integrität von Caco-2 Zellmonolayern dargestellt.

Veränderte Transporteigenschaften können sich auch durch die Bindung von Arzneistoffen an Proteine des Nahrungsbreis oder des Blutplasmas ergeben. Abbildung 7 zeigt den Einfluß verschiedener Kon-



Abb. 6: Robustheit des Caco-2 Modells -Einfluß von DMSO auf die Integrität von Caco-2 Zellmonolayern. Dargestellt sind die apparenten Permeationskoeffizienten für den Integritätsmarker Fluorescein beim Transport über Caco-2 Monolayer (n=3  $\pm$ SD) und einen zellfreien Filter (n=1).



Abb. 7: Robustheit des Caco-2 Modells -Einfluß von BSA auf die Transportgeschwindigkeit verschiedener Markersubstanzen. Dargestellt sind die apparenten Permeationskoeffizienten ( $P_{app}$ ) von Atenolol, Fluorescein und Propranolol ohne BSA und mit BSA in verschiedenen Konzentrationen. (n=3 ± SD).



Die in Abbildung 6 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass DMSO in Konzentrationen bis zu 2% v/v keinen Einfluß auf die Integrität des Caco-2 Zellmonolayers hat. Die apparenten Permeationskoeffizienten für Fluorescein (Integritätsmarker) liegen deutlich unter dem in unserem Labor maximal zulässigen Wert von 1·10<sup>-6</sup> cm·s<sup>-1</sup>. Abbildung 7 zeigt, dass der Fluoresceintransport in Abhängigkeit von der apikalen BSA-Konzentration deutlich sinkt, während der Transport von Atenolol nur wenig beeinflußt wird.

### **4** Diskussion

Die Caco-2 Zellen entwickeln sich sowohl auf festen Substraten als auch auf porösen Filtern aus Polyester zu differenzierten Enterozyten. Dabei bilden sie dichte Zellverbände, in denen die benachbarten Zellen durch "tight junctions" miteinander verbunden sind. Neben der Ausbildung eines Bürstensaums, bilden die Monolayer flüssigkeitsgefüllte Halbblasen, die sogenannten "domes", (siehe elektronenmikroskopische Aufnahme: Abbildung 1). Als weiteres Differenzierungsmerkmal ist schon 6 Tage nach der Aussaat alkalische Phosphatase nachzuweisen. Bei 14 Tage alten Zellen sind nahezu alle Zellen positiv für alkalische Phosphatase. Wenn die Zellen auf permeablen Filtern wachsen, können der Wachstumsverlauf und die Ausbildung von dichten Zell-Zell-Kontakten durch die regelmäßige Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) verfolgt werden. Durch die Messung des TEER und die Permeation von hydrophilen Markersubstanzen wie Fluorescein, die den Zellmonolayer parazellulär überwinden, ist es möglich, die Integrität der Zellmonolayer zu überwachen. Darüberhinaus läßt sich durch Langzeitmonitoring der absorptiven Eigenschaften mit geeigneten Permeabilitätsmarkern die Konformität verschiedener Zellpassagen überprüfen. Die Generation einer großen Anzahl solcher Permeabilitätsdaten bildet die Grundlage zur Festlegung von Qualifikationskriterien, mit deren Hilfe sich die

Qualität einzelner Monolayerchargen im Hinblick auf Transportstudien überprüfen läßt.

Die dargestellten Untersuchungen zeigen, dass mit Hilfe des Caco-2 Modells langsamer parazellulärer und schneller transzellulärer Transport unterschieden werden können. Ferner können durch Vergleich des Transportes in die absorptive Richtung (apikal-basolateral) und die sekretive Richtung (basolateral-apikal) Substanzen identifiziert werden, die mit aktiven Carrierproteinen wechselwirken. Neben den hier untersuchten Effluxsystemen, wie dem P-Glykoprotein, welches eine bedeutende Rolle bei der sekretorischen Detoxifikation im Gastrointestinaltrakt spielt, sind auch zahlreiche Systeme identifiziert, welche primär der Aufnahme von Nährstoffen (Peptiden, Aminoasäuren, kurzkettigen Fettsäuren, Hexosen), Hormonen, Vitaminen oder Ionen dienen. Über solche Transportsvsteme werden auch manche Arzneistoffe aktiv in die Zelle transportiert. Peptidoder peptidähnliche Arzneistoffe wie B-Lactam-Antibiotika, Bestatin oder das als Acyclovir-Prodrug dienende L-Valin-Acyclovir werden beispielsweise über den Oligopeptid-Transporter Pept-1 aufgenommen, welcher sowohl von intestinalen Epithelzellen als auch von Caco-2 Zellen exprimiert wird (Adibi, 1997; Saito, 1997; Han et al., 2000).

Weitere Beispiele sind die Aufnahme des HMG-CoA Reduktase Inhibitors Atorvastatin durch den H<sup>+</sup>/Monocarbonsäure Co-Transporter (MCT) (Wu et al., 2000) oder des Antikonvulsivums Pregabalin über den LNAA-Transporter, dessen physiologische Aufgabe im Transport großer neutraler Aminosäuren wie Phenylalanin und Prolin liegt (Jezyk, 1999). Der LNAA-Transporter wird jedoch nur vom gastrointestinalen Epithel exprimiert, während Caco-2 Zellen unter Standardkulturbedingungen keine LNAA-Aktivität zeigen (Jezyk et al., 1999).

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass Selektivität und Spezifität des Caco-2 Systems als Modell der intestinalen Barriere im Hinblick auf das Effluxsysetm P-Glycoprotein gegeben sind. Diese Parameter müssen jedoch für jeden Carrier, der am Transport eines untersuchten Arzneistoffs beteiligt ist, überprüft werden. Je umfassender aktive Transportsysteme charakterisiert werden, desto genauer kann die *in vivo* Absorption von Arzneistoffen mit Hilfe des Caco-2 Modells oder anderen *in vitro* Modellen prognostiziert werden.

Die Robustheit des für Transportstudien eingesetzten Systems von Caco-2 Zellmonolayern auf permeablen Filtern testeten wir für zwei potentielle Einflußgrößen. Zum einen wurde der Einfluß von bis zu 2% v/v DMSO, welches häufig zum Lösen schlecht wasserlöslicher Testsubstanzen verwendet wird, auf die Integrität von Caco-2 Zellmonolayern untersucht. Zum anderen überprüften wir die Wirkung von Protein (hier BSA) im apikalen Testmedium auf die Transportgeschwindigkeit von Markersubstanzen.

Die eingesetzten Mengen an DMSO zeigten keinen Einfluß auf die Integrität der Caco-2 Zellmonolayer. Das Caco-2 Testsystem für Permeabilitätsstudien kann demnach auch für Substanzen eingesetzt werden, deren geringe Wasserlöslichkeit die Verwendung des organischen Lösungsmittels DMSO erfordert.

Die Ergebnisse der hier beschriebenen Experimente mit BSA zeigen, dass Proteinbindung einen unterschiedlich starken Einfluß auf die Transportgeschwindigkeit bestimmter Substanzen hat. Vergleicht man beispielsweise die beiden parazellulären Marker Atenolol und Fluorescein, so zeigt sich, dass der Fluoresceintransport unter BSA-Einfluß viel stärker reduziert wird als der Transport von Atenolol. BSA wurde hier stellvertretend für komplexere Proteinzusammensetzungen, wie der des Blutserums eingesetzt. Mit der beschriebenen Versuchsanordnung ist daher zwar keine quantitative Beurteilung, jedoch eine qualitative Abschätzung der Plasmaproteinbindung möglich. Für Atenolol und Fluorescein ist die beobachtete BSA-Bindung mit unabhängigen Plasmabindungsdaten vergleichbar. Während für Fluorescein eine 60%ige Bindung an Plasmaproteine angegeben wird (persönliche Mitteilung), zeigt Atenolol nur eine geringe Affinität (6-16 %) zu Proteinen des Blutplasmas (persönliche Mitteilung).

Zusammenfassend belegen die dargestellten Daten die Eignung des Caco-2 Modells zur schnellen und reproduzierbaren Bestimmung der Permeabilität von Arzneistoffen. Die Selektivität des Modells ermöglicht die Einteilung von Arzneistoffen in Permeabilitätsklassen, was eine Grundvoraussetzung für eine Ver-



gleichbarkeit von Daten unterschiedlicher Laboratorien darstellt. Spezifische Interaktionen von Arzneistoffen mit Carrierproteinen können teilweise am Caco-2 Modell untersucht werden. Abweichungen in der Aktivität von Carrierproteinen und metabolischen Enzymen zwischen Caco-2 Modell und dem gastointestinalen Epithel müssen weiter herausgearbeitet werden, um die Voraussagbarkeit der in vivo Permeabilität zu präzisieren. Die zunehmende Charakterisierung und Qualifizierung des Caco-2 Modells spiegelt sich in seinem Bedeutungswandel vom experimentellen Arbeitsmittel zur Untersuchung der gastrointestinalen Barriere zum qualifizierten Modell, welches Tierversuche teilweise ersetzen kann, wider.

### Literatur

- Adibi, S. A. (1997). The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology 113 (1)*, 332-40.
- Amidon, G.L., Gordon, L., Lennernäs, H., Shah, V. P. and Crison, J. R. (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceut. Res.* 12 (3), 413-420.
- Brewis, I. A., Howell, S., Hooper, N. M. et al. (1993). Membrane peptidase expression by confluent cultures of Caco-2 cells. *Biochem. Soc. Trans. 21*, 252.

- Dressman, J. B. and Reppas, C. (2000). *In vitro*-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. Eur *J Pharm Sci. 11, Suppl 2,* 73-80.
- Han H., de Vrueh, R. L., Rhie, J. K. et al. (1998). 5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter. *Pharmaceut. Res* 15(8), 1154-1159
- Hidalgo, I. J. Raub, T. J. and Borchardt, R. T. (19989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterol.* 96, 736-749.
- Howell, S., Kenny, A. J. and Turner, A. J. (1992). A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29. *Biochem. J.* 284, 595-601.
- Hunter, J., Jepson, M. A., Tsuruo, T. et al. (1993). Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* 268, 14991-14997.
- Jezyk N., Li, C., Stewart, B. H., Wu, X., Bockbrader and H.N., Fleisher ,D. (1999) Transport of pregabalin in rat intestine and Caco-2 monolayers. *Pharmaceut. Res.* 16(4), 19-26.
- Madara, J. L., Stafford, J., Dharmsathaphorn, K. et al. (1987). Structural analysis of a human intestinal epithelial cell line. *Gastroenterol.* 92, 1133-1145.
- Millonig, G. (1961). A modified procedure for lead staining of thin sections. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 736.

- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.-D. et al. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* 47, 323-330.
- Richardson, K. C., Jarrett, L. and Finke, H. (1960). Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technology* 35, 313-323.
- Romeis, B. (1989). Mikroskopische Technik. 17. Aufl. ed. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg.
- Saito, H. (1997). Yakugaku Zasshi. 117(8), 522-41, Abstract.
- Sakai, M., Noach, A. B. J., Blom-Roosemalen, M. C. M. et al. (1994). Absorption Enhancement of Hydrophilic Compounds by Verapamil in Caco-2 Cell Monolayers. *Biochem. Pharmacol.* 48, 1199-1210.
- Wu, X., Whitfield, L. R. and Stewart, B. H. (2000). Atorvastatin transport in the Caco-2 cell model: contributions of Pglycoprotein and the proton-monocarboxylic acid co-transporter. *Pharmaceut. Res.* 17(2), 209-215.

### Korrespondenzadresse

Dr. Eleonore Haltner Across Barriers GmbH Science Park Saar Postfach 15 11 61 66041 Saarbrücken Tel.: +49-681-95 91 88 10 Fax: +49-681-95 91 88 02 E-mail: info@acrossbarriers.de www.acrossbarriers.de