

Markertransport über biologische Barrieren *in vitro*: Vergleich von Zellkulturmodellen für die Dünndarmschleimhaut, die Blut-Hirn-Schranke und das Alveolarepithel der Lunge

Christiane Gindorf¹, Anne Steimer¹, Claus-Michael Lehr², Udo Bock³,
Stefan Schmitz¹ und Eleonore Haltner¹

¹Across Barriers GmbH, D-Saarbrücken, ²Institut für Biopharmazie und pharmazeutische Technologie, D-Saarbrücken

Zusammenfassung

Um auf die ansteigende Flut neuer Wirkstoffe, die heutzutage durch kombinatorische Chemie oder molekularbiologische Syntheseverfahren zur Verfügung steht, reagieren zu können, steigt der Bedarf an Selektionsverfahren, mit deren Hilfe sich gleichermaßen schnell und kostengünstig die Kandidaten mit dem höchsten Entwicklungspotential herausfiltern lassen. Dazu müssen grundlegende biopharmazeutische Parameter bereits in sehr frühen Phasen der Arzneistoffentwicklung untersucht werden. Eine Voraussetzung für die Wirksamkeit eines Pharmakons ist seine Fähigkeit, die natürlichen Schutzmechanismen des Körpers zu überwinden. Mit Hilfe von einschichtigen Zellverbänden können verschiedenste biologische Barrieren "im Reagenzglas" simuliert werden. Neben ethischen Aspekten haben *in vitro* Testsysteme den Vorteil, dass Permeabilitätsuntersuchungen bei hohem Durchsatz unter kontrollierten, reproduzierbaren Bedingungen durchgeführt werden können. Die Validität eines Modells spiegelt sich letztendlich in der Genauigkeit wider, mit der das Verhalten eines Wirkstoffes an der korrespondierenden *in vivo* Barriere vorausgesagt werden kann.

Summary: Marker Transport across biological barriers *in vitro*: Comparison of cell culture models for the gastrointestinal barrier, the blood-brain barrier and the alveolar epithelium of the lung

*In order to respond to the flood of new active ingredients currently being generated by combinatorial chemistry or molecular biological synthesis, selection procedures able to filter out rapidly and economically those drug candidates with the highest development potential are required. This necessitates the measurement of fundamental biopharmaceutical parameters very early in the drug development process. Any pharmaceutically active agent must be able to overcome the body's natural protective mechanisms. A broad variety of biological barriers can be simulated in the laboratory by cell monolayer models. Apart from ethical aspects, the advantage of these *in vitro* test systems is that permeability studies can be performed at high throughput rates under controlled and reproducible conditions. The validity of such a model is ultimately reflected in its ability to accurately predict the behaviour of an active ingredient at the corresponding *in vivo* barrier.*

Keywords: gastrointestinal, blood brain barrier, pulmonary delivery, drug screening, *in vitro*, permeability studies, BCS

1 Einleitung

Unser Körper wird durch unsere Haut vor äußeren Einflüssen geschützt. An den Eintrittspforten des Körpers übernehmen die Schleimhäute des Nasopharyngealraumes, des Gastrointestinaltraktes, des Respirationstraktes oder des Urogenitaltraktes diese Aufgabe. Diese als biologische Barrieren bezeichneten Gewebe bieten nicht nur einen mechanischen Schutz, sondern erschweren daneben die Aufnahme körperfremder Stoffe wie Umweltschadstoff-

fe, aber auch einiger pharmazeutischer Wirkstoffe. Bevor ein extravaskulär verabreichter Arzneistoff den Systemkreislauf erreichen kann, muß er eine dieser Barrieren überwinden. Voruntersuchungen, die die Fähigkeit eines neu entwickelten Pharmakons zur Überquerung verschiedener biologischer Barrieren klären können, sind für die pharmazeutische Industrie von großer Bedeutung. Dies gilt insbesondere, wenn es gelingt, verlässliche Untersuchungen *in vitro* durchzuführen. Neben ethischen Aspekten kommen dabei auch

finanzielle Gesichtspunkte zum Tragen. Voraussetzung für *in vitro* Permeabilitätsstudien ist die Kultur epithelialer bzw. endothelialer Zellen in Form eines dichten einschichtigen Zellverbandes (Monolayer).

Für die Tauglichkeit einer *in vitro* Barriere ist die Ausbildung von dichten interzellulären Kontakten (*tight junctions*, *TJ*) eine zwingende Voraussetzung. Die *TJ* verschließen den Interzellularspalt und verhindern dadurch einen unkontrollierten Stoffaustausch von einer Seite der Zell-

schicht zur anderen (Gumbiner, 1993; Madara, 1988). Lipophile Moleküle können mit der Zellmembran in Wechselwirkung treten und die Zellschicht durch einzelne Zellen hindurch überqueren. Diesen transzellulären Stoffaustausch kontrollieren sogenannte Effluxpumpen. Dabei handelt es sich um große Proteinmoleküle, die die Zellmembran durchspannen und in die Zelle eingedrungene Fremdmoleküle unter Energieverbrauch wieder ausschleusen. Das P-Glykoprotein (Pgp, p170) oder *Multidrug Resistance Protein* (MDR-1) spielt eine herausragende Rolle bei dieser Entgiftungsreaktion (Kerb et al., 2001; Hunter et al., 1993). Eine Wechselwirkung mit dem P-Glykoprotein kann die Bioverfügbarkeit eines Pharmakons drastisch verringern (Wacher et al., 2001).

Als *in vitro* Modell für biopharmazeutische Permeabilitätsuntersuchungen an der gastrointestinalen Barriere hat sich die Adenokarzinomzelllinie Caco-2 (Fogh, 1977) bewährt. Sie gewinnt seit etwa 10 Jahren zunehmende Bedeutung in der pharmazeutischen Forschung. Im August 2000 verabschiedete die *amerikanische Food and Drug Administration* (FDA) eine Industrierichtlinie (<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>), welche ein Klassifizierungssystem für pharmazeutische Wirkstoffe aus schnell freisetzenden, festen, oral verabreichten Formulierungen propagiert. Das sogenannte *Biopharmaceutics Classification System* (BCS) teilt Arzneistoffe anhand ihrer Löslichkeit und ihrer Permeabilität über die Darmschleimhaut ein. Unter der Voraussetzung einer schnellen Dissolution und einer hinreichenden Stabilität der Arzneiform kann für Vertreter der Wirkstoffklasse I ein *Biowaiver*, d.h. ein Verzicht auf *in vivo* Bioverfügbarkeits- und Bioäquivalenzstudien beantragt werden. Die Charakterisierung und Qualifizierung des Caco-2 Modells im Hause der *Across Barriers GmbH* war bereits Gegenstand eines früheren Artikels in *Altex* (Haltner et al., 2001).

Für die Blut-Hirn Schranke und die alveolare Barriere stehen bisher keine kommerziell erhältlichen Zelllinien zur Verfügung, welche die physikalischen und biochemischen Eigenschaften der entsprechenden *in vivo* Barrieren in ausreichendem Maße widerspiegeln. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von frischem humanen Lungengewebe, verwendet *Across*

Barriers zur Simulation der alveolaren Barriere ein *in vitro* Modell, welches auf Alveolarepithelzellen vom Schwein (PAEC, *Porcine Alveolar Epithelial Cells*) basiert. Dabei werden zunächst die unempfindlicheren Typ-II-Zellen isoliert, die dann in Kultur eine Differenzierung zu Typ-I-Zellen durchlaufen, was mit einer Abnahme der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase einhergeht. Ein weiteres *in vitro* Modell für die Blut-Hirn Schranke besteht aus einschichtigen Verbänden von Endothelzellen (PBEC, *porcine Brain Endothelial Cells*), welche frisch aus Schweinhirnapillaren isoliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die verwendeten Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Biochrom KG (D-Berlin): *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM), M 199 Medium, nicht-essentielle Aminosäuren (NEA), Trypsin-EDTA-Lösung, Gentamicinsulfat; *Sigma Chemicals* (D-Deisenhofen) oder Fluka (D-Neu-Ulm): Atenolol, Propranolol, Metoprolol, Fluorescein, Rhodamin 123, Carbamazepin, Antipyrin, Naproxen, Theophyllin, Verapamil, Hydrocortison, Koffein, Ketoprofen, Labetalol, Ranitidin, Hydrochlorothiazid, Furosemid, Amoxicillin, Hämatoxylin, Dextran, Kit 86R zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase; Paraformaldehyd; Biomol (D-Hamburg): Ampicillin; *NEN Life Science Products* (B-Zevingen): ^3H -Mannitol; Hoffman-La Roche (CH-Basel): Dispace II, Collagenase/Dispace; Amersham Pharmacia Biotech: ^3H -Dexamethason; Chemicon (D-Hofheim): monoklonaler Antikörper ZO-1 (Ratte, IgG); Greiner Labortechnik (D-Frickenhäusen): Fötale Kälberserum (FKS); Biochrom KG (D-Berlin): DME/F12, Ochsen Serum; Seromed (D-Berlin): Kollagen G; *Cell Systems* (D-St. Katharinen): Fibronectin, SAGM Bullet Kit; Becton Dickinson (D-Heidelberg): Kollagen; Merck (D-Darmstadt): Methanol; Merck (D-Darmstadt) oder Fluka (D-Neu-Ulm): Salze für das Ansetzen der Pufferlösungen; Costar (D-Wiesbaden): Zellkulturflaschen (75 cm²) und Transwellplatten. Alle anderen Einmalartikel für die Zellkultur wurden von Biochrom KG (D-Berlin) bezogen. Ammoniumchlorid, Triton X-100, Propidiumiodid und FluorSaveTM wur-

den freundlicherweise vom Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie (D-Saarbrücken) zur Verfügung gestellt.

2.2 Isolierung primärer Zellen

Die Isolierung von zerebralen kapillären Endothelzellen aus Schweinehirn (PBEC) wurde wie in der Dissertation von Franke (Franke, 1997) beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die Schweinehirnhälften auf dem Schlachthof frisch entnommen. Die Hirnhäute mit den ihnen anhaftenden Gefäßen sowie die sekretorischen Bereiche wurden entfernt. Anschließend wurde die graue und weiße Masse des Hirns mit Hilfe eines sterilen Kräuterschneiders homogenisiert und in 37°C warmem Präparationsmedium (M 199, serumfrei) zu einem Endvolumen von 100 ml pro Gehirn aufgenommen. Nach Zugabe von 1% (w/v) Dispace II erfolgte bei 37°C unter Rühren eine dreistündige Inkubation. Zur Isolierung der nun freigesetzten Kapillaren wurden jeweils 100 ml Homogenisat mit 150 ml 4°C kalter 18%iger Dextranlösung versetzt, durchmischt und bei 4°C mit 6800 x g zentrifugiert. Die als Pellet gewonnenen Kapillarfragmente wurden in Kulturmedium (M 199, serumhaltig (10%)) resuspendiert und durch Nylongaze mit einer Maschenweite von 180 µm filtriert. Zur weiteren mechanischen Zerkleinerung wurde die Suspension dreimal kräftig aus einer auf dem Boden einer Petrischale aufgesetzten Glaspipette herausgepreßt. Anschließend wurde ein einstündiger Verdau bei 37°C mit 0,1% (w/v) Collagenase/Dispace in Kulturmedium durchgeführt. Die isolierten Endothelzellen wurden 10 min bei 110 x g zentrifugiert und das Pellet nach Dekantieren des Überstandes in Präparationsmedium suspendiert. Es schloß sich eine Dichtegradientenzentrifugation in einem diskontinuierlichen Percollgradienten an. Dieser setzte sich aus 15 ml einer Percoll-Lösung mit einer Dichte von 1,07 g/cm³ zusammen, die mit 20 ml einer Percoll-Lösung der Dichte 1,03 g/cm³ überschichtet wurde. 10 ml des resuspendierten Zellpellets wurden auf den Gradienten aufgetragen und bei 1250 x g für 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war eine scharfe, durch Erythrozyten rot gefärbte Bande in der unteren Hälfte des Gradienten zu erkennen, welche die Endothelzellen enthielt. Die Bande wurde mit einer Pipette abgezogen, zum Auswaschen des

Percolls mit Präparationsmedium versetzt und 10 min bei 110 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und auf Kollagen G beschichtete Kulturflaschen ausgesät. Die Präparation von alveolaren Epithelzellen aus Schweinelunge erfolgte in Anlehnung an die von Elbert publizierte Methode (Elbert, 1999) zur Präparation von humanen Alveolarepithelzellen. Davon abweichend wurde das Gewebe manuell mit Hilfe von Skalpellern zerkleinert. Beim Verdau wurde zusätzlich das Enzym Elastase eingesetzt. Die Behandlung mit *magnetic beads* entfiel.

2.3 Zellkultur Caco-2

Die verwendeten Caco-2 Zellen wurden freundlicherweise vom Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie (D-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% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchte kultiviert. Zur Vermehrung der Zellen erfolgte die Aussaat in 75 cm² Kulturflaschen mit einer Dichte von 10⁶ Zellen pro Flasche. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage erneuert. Die Zellen wurden einmal pro Woche passagiert. Für Transportexperimente wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA Lösung geerntet und mit einer Dichte von 6·10⁴ Zellen/cm² auf Transwell®-Clear Filtereinsätze ausgesät. Die Filter bestehen aus Polyester und haben eine Fläche von 1,13 cm² sowie einen Porendurchmesser von 0,4 µm. Für die Versuche wurden Caco-2 Monolayer der Passagen 11-50 verwendet. Die verwendeten Zellen repräsentieren die parentale Caco-2 Zelllinie, 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.

PBEC (*porcine brain endothelial cells*)

Die frisch präparierten PBEC Zellen wurden in Kulturmedium suspendiert und auf Kollagen G beschichtete Kulturflaschen ausgesät. Die Aussaatfläche für die Aus-

beute eines Hirnes betrug ca. 450 cm² (6 Flaschen). Die frisch präparierten Zellen wurden am folgenden Tag zur Entfernung von Zelldebris und Erythrozyten (nicht adhären) zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit frischem Kulturmedium versorgt. Nach 3-4 Tagen wurden die subkonfluenten Zellen passagiert. Dazu wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und pro 75 cm² Kulturflasche mit 5 ml Trypsinlösung (1:250 in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Unter leichtem Schütteln lösten sich die Endothelzellen von der Wachstumsfläche ab, während kontaminierende Fremdzellen noch am Flaschenboden verblieben. Durch mehrfaches schnelles Aufziehen der Suspension in einer Glaspipette konnten die Zellcluster in kleine Trauben vereinzelt werden. Zur Inhibierung des Trypsins wurde anschließend 4 ml Ochsen Serum zugegeben. Nach einer Zentrifugation (10 min bei 110 x g) wurde das Pellet in Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von ca. 4-5·10⁵ Zellen/Filter (1,13 cm²) auf mit Rattenschwanzkollagen beschichtete Transwell® Filter ausgesät. Das Rattenschwanzkollagen wurde wie in der Dissertation von Franke (Franke, 1997) beschrieben gewonnen. Die Endothelzellen wurden bis zur Konfluenz (nach 3-5 Tagen) kultiviert, bevor sie zu Untersuchungen herangezogen wurden. Am 5.-6. Tag nach der Präparation wurden sie auf serumfreies DME/F12 Medium umgestellt. Die Inkubation der Kulturplatten erfolgte in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂.

PAEC (*porcine alveolar epithelial cells*)

Die frisch präparierten PAEC-Zellen (*porcine alveolar epithelial cells*) werden im Anschluß an die Isolation in dem zur Kultivierung eingesetzten SAGM resuspendiert und in einer Dichte von 4-9·10⁵ Zellen/cm² auf mit Fibronectin/Kollagen beschichtete Transwell® Clear Filter ausgesät. Kultiviert werden die Zellen unter *liquid-covered conditions*, d.h. 0,5 ml Medium *apikal* und 1,5 ml *basolateral*. In wasserdampfgesättigter Atmosphäre, bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ erreichen die Monolayer nach ca. vier Tagen Konfluenz und können in Abhängigkeit von der Entwicklung der TEER-Werte am 7.-10. Kulturtag zu Permeationsuntersuchungen herangezogen werden.

HAEC (*human alveolar epithelial cells*)

Die HAEC Monolayer, mit denen vergleichende Transportexperimente durchgeführt wurden, wurden als fertig kultivierte, konfluente Monolayer vom Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie (D-Saarbrücken) bezogen.

2.4 Bestimmung des TEER

Vor und nach allen Transportexperimenten wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) der Zellmonolayer gemessen. Hierfür wurde die EVOM® Apparatur mit STX2-Elektrode (World Precision Instruments, USA-Sarasote) eingesetzt.

2.5 Permeationsstudien

Die Permeationsuntersuchungen an Caco-2 Zellmonolayern wurden in Transwell®-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 Äquilibration der Zellen wurde der Krebs-Ringer Puffer im Donor-Kompartiment 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_{app} in cm·s⁻¹) wurde mit der Gleichung $P_{app} = \frac{dQ}{dt \cdot 1/m_0 \cdot 1/A \cdot V_{Donor}}$ 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_{Donor} (Donorvolumen)· dQ/dt beschreibt den „steady state flux“ in µg·ml⁻¹ pro Zeiteinheit. A (1,13 cm²) ist die Fläche des exponierten Zellmonolayers und m_0 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.

Die Transportuntersuchungen an primären porcinen Kapillarendothel- (PBEC) und Alveolarzellen (PAEC) wurden in den

entsprechenden Kulturmedien (siehe 2.3) durchgeführt. Zur Probenaufgabe wurde das Kulturmedium nur teilweise abgesaugt und das entfernte Volumen durch die Testlösung ersetzt. Alle anderen Schritte wurden in Analogie zu den Transportstudien mit Caco-2 Zellen durchgeführt.

2.6 Kern-Färbung mit Hämatoxylin nach Gilles

Nach einer Methanol-Fixierung bei 4°C für 30 min wurden die PAEC-Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 2 min bei Raumtemperatur mit der Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Vor dem Aufbringen der Deckgläser auf die Glasobjektträger wurde überschüssiges Hämatoxylin durch dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser und durch einen 10 minütigen Waschschriff mit Leitungswasser entfernt. Die Beobachtung erfolgte mit einem Lichtmikroskop der Firma Leica (D-Bensheim), die Aufnahmen entstanden mit Hilfe einer angeschlossenen Digitalkamera der Firma Nikon, COOLPIX 990.

2.7 Alkalische Phosphatase-Färbung

Der Alkalischen Phosphatase-Färbung ging ebenfalls eine Methanol-Fixierung der PAEC-Zellen bei 4°C für 30 min bei den älteren Zellen in Kultur voraus, bei den frisch präparierten Zellen erfolgte die Fixierung durch Lufttrocknung. Die weitere Vorgehensweise folgte der beschriebenen Methode der Firma Sigma, die zusammen mit dem entsprechenden Kit 86R geliefert wird.

2.8 Immunfluoreszenz

Für die Antikörperfärbung wurden die kultivierten PAEC-Zellen nach drei Waschschriffen mit PBS mit PFA 2%/NH₄Cl 50 µM/TritonX 0,1% fixiert, wobei nach jedem Schritt wieder drei Waschschriffen mit PBS eingefügt wurden. Die Fixierung lief wie im Folgenden beschrieben: Fixierung mit PFA 2% in PBS (Paraformaldehyd) für 10 min bei RT, Inkubation mit 50 µM NH₄Cl-Lösung (Ammoniumchlorid), ebenfalls für 10 min bei RT, Behandlung mit TritonX 0,1% in PBS für 7-8 min bei RT.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ für 30-60 min. Nach der gründlichen Entfernung des überschüssigen Antikörpers durch drei Waschschriffen mit Puffer schloß sich die

Inkubation mit einem Fluorescein-markierten, sekundären Antikörper für 30 min unter den obigen Bedingungen an. Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid gefärbt, welches zusammen mit dem sekundären Antikörper aufgegeben wurde. Das *mounting* auf Objektträger erfolgte nach drei weiteren Waschschriffen, indem die Filter mit Hilfe einer Skalpellklinge ausgeschnitten und mit Fluor SaveTM konserviert wurden. Die Aufnahmen wurden mittels clsm (*confocal laser scanning microscopy*) am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität des Saarlandes (D) mit freundlicher Unterstützung von Herrn Ehrhardt durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Caco-2 Zellmonolayer als Modell für die humane Dünndarmschleimhaut

Vor dem Hintergrund des BCS-Systems (Amidon et al., 1995), welches Eingang in eine FDA Richtlinie (Hussain, 2000) gefunden hat, wurde die Permeabilität einer Reihe von Modellsubstanzen untersucht. Ziel war es, einerseits die Selektivität des Caco-2 Modells mit einer größe-

ren Anzahl von Substanzen zu überprüfen, zum anderen, den Bezug der am Caco-2 Modell gewonnenen Daten zur *in vivo* Situation herzustellen. Die genannte Richtlinie führt im Appendix eine Reihe von pharmazeutischen Wirkstoffen auf, denen verschiedene *in vivo* Permeabilitätsklassen zugeordnet sind (unterschieden wird hier nur in hoch und niedrig). Legt man die bei *Across Barriers* gültigen Grenzwerte für niedere und hohe *in vitro* Permeabilität (Haltner et al., 2001) zugrunde, so ergibt die Permeabilitätsbestimmung *in vitro* für alle getesteten Substanzen dieselbe Zuordnung wie von der FDA beschrieben (Abb.1). Dies zeigt, dass das Caco-2 Modell eine selektive Einteilung von Substanzen in unterschiedliche Permeabilitätsklassen erlaubt und eine hohe Übereinstimmung mit der Absorption *in vivo* gegeben ist.

3.2 Primäre zerebrale Schweineendothelzellen als *in vitro* Modell für die BHS

Gerade bei Zellen primären Ursprungs kann die Qualität des isolierten Materials stark variieren. Um Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der erhobenen Meßdaten dennoch zu gewährleisten, müssen Standards

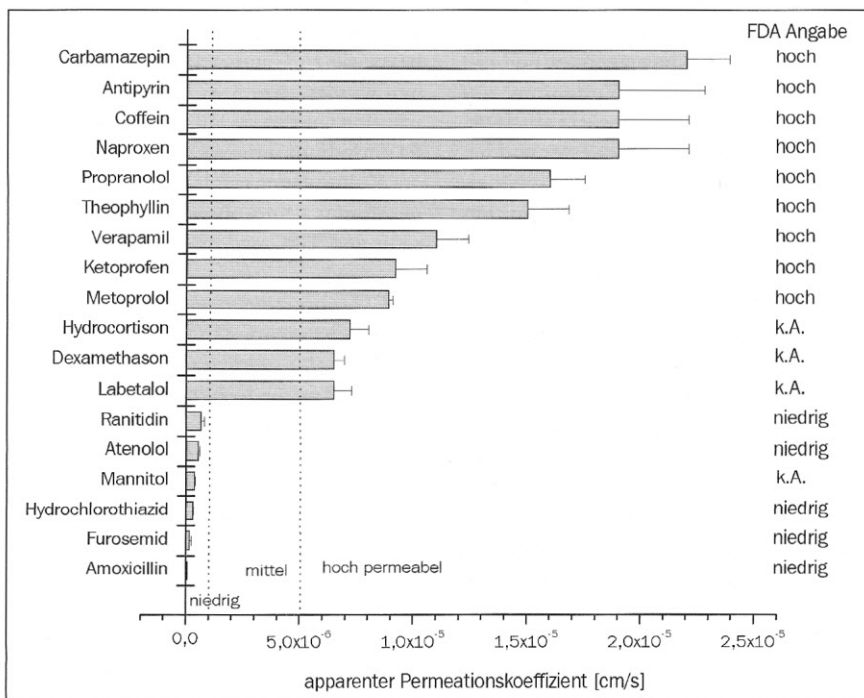


Abb. 1: Permeabilität von Modellsubstanzen über die gastrointestinale Barriere. Dargestellt sind die apparenten Permeationskoeffizienten, die an Caco-2 Zellmonolayern bestimmt wurden. Die Daten wurden mit unabhängigen Angaben der FDA (Hussain, 2000) verglichen; k. A.: keine Angabe.

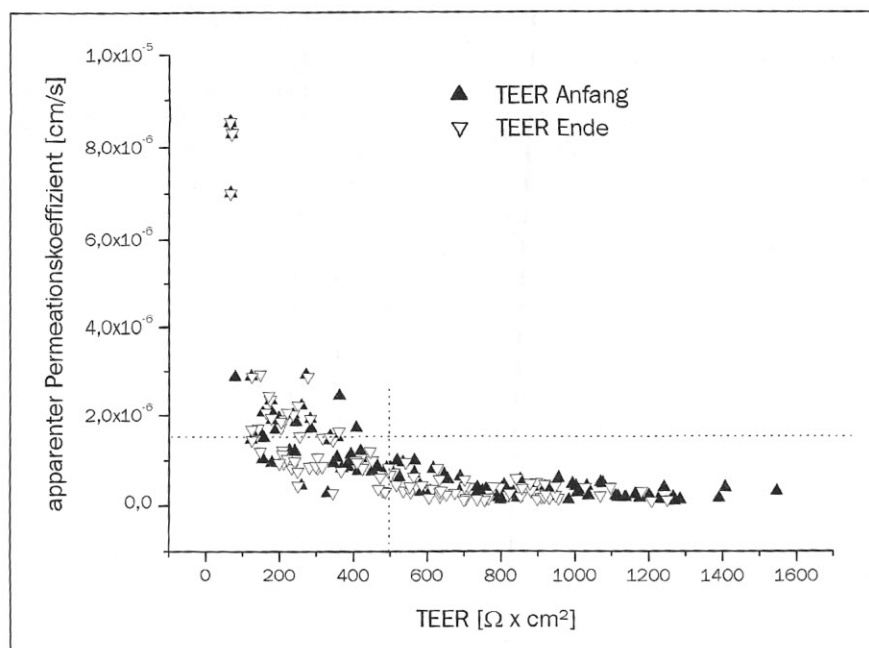


Abb. 2: Abhängigkeit des apparenten Permeationskoeffizienten von Fluorescein vom transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER). Der TEER wurde am Anfang und am Ende jedes Transportexperimentes gemessen.

festgelegt werden, mit deren Hilfe sich die Qualität des Systems bemessen läßt.

In Abbildung 2 ist die Permeabilität von Fluorescein in Abhängigkeit des TEER-Wertes aufgetragen, der an den Zellmonolayern zu Beginn bzw. am Ende einer Permeabilitätsstudie gemessen wurde. Der TEER der verschiedenen PBEC-Chargen schwankte dabei zwischen 0 und 16.00 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Oberhalb eines TEER-Wertes von 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ist die Fluoresceindurchlässigkeit der Monolayer nahezu unabhängig vom Widerstand. Aufgrund dieses Befundes wurde für PBEC-Monolayer, die zu Permeabilitätsstudien eingesetzt werden sollen, ein Mindest-TEER-Wert von 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ festgelegt. Zellmonolayer, die diesen Qualitätsstandard nicht erreichen, müssen verworfen werden.

Ähnlich wie für den TEER, wurden auch Grenzwerte für den apparenten Permeationskoeffizienten von Markersubstanzen festgelegt. Mit Hilfe der nieder permeablen Substanz Fluorescein kann die Integrität der Zellmonolayer einer jeden Zellcharge (alle gleich behandelten Zellmonolayer einer Präparation) überprüft werden. Um die Selektivität des Modells bezüglich hoher und niedriger Permeabilität darzustellen, wurde zusätzlich das hoch permeable Propranolol verwendet. Aufgrund der über viele Zellchargen gemessenen P_{app} -Werte (Abb. 3) sowie der Korrelation von P_{app} und

TEER (Abb. 2) wurde für Fluorescein ein maximal zulässiger P_{app} -Wert von $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ festgelegt. Für Propranolol wurde ein minimal zulässiger Wert von $1 \cdot 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ festgesetzt.

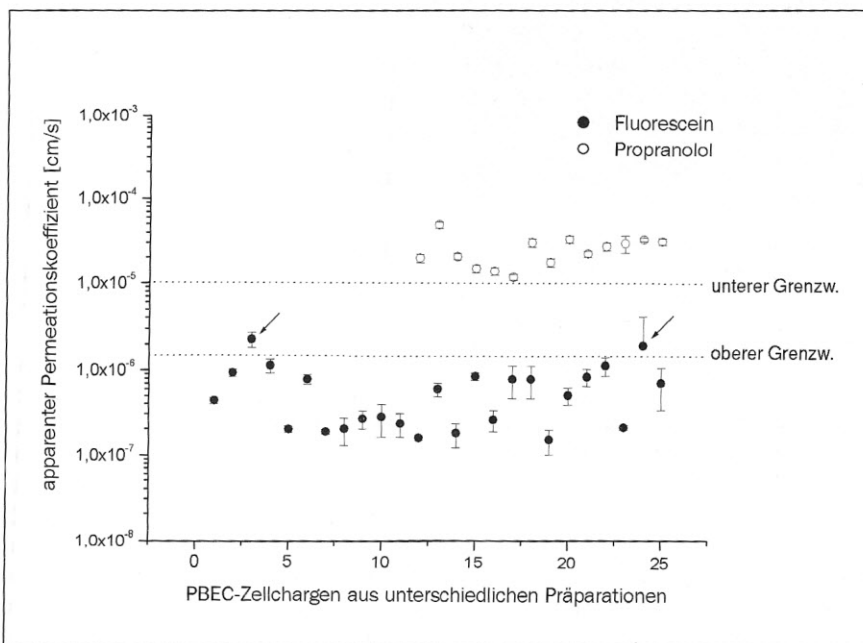


Abb. 3: Qualitätsmonitoring der bei Across Barriers produzierten PBEC-Zellchargen bezüglich Dichtigkeit und Selektivität für hoch und nieder permeable Substanzen. Dargestellt sind die apparenten Permeationskoeffizienten für Fluorescein und Propranolol mit den zugehörigen Grenzwerten. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Meßwerte lagen außerhalb der Qualitätsstandards, die zugehörigen Zellchargen wurden deshalb nicht zu Permeabilitätsstudien eingesetzt.

3.3 Porcine Alveolarepithelzellen simulieren die alveolare Barriere

Abbildung 4 zeigt einen typischen Monolayer von PAEC-Zellen nach 6 Tagen Kultur auf Transwell®-Filtern. Man erkennt bereits die Formierung abgeflachter großflächiger Zellen, neben kleineren abgerundeten Zellen. Nach 7 Tagen (Abb. 5) wird die Wachstumsfläche fast ausschließlich von diesen flachen Zellen mit Typ-I-Zellen ähnlicher Morphologie bedeckt. Die Ausbildung von engen Zell-Zell Kontakten konnte durch Anfärbung der *tight junctions* mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Abb. 5 zeigt einen konfluenten Monolayer aus PAEC-Zellen, deren interzelläre Verknüpfungen durch Färbung des ZO-1 (*zonula occludens*) Proteins, eines zentralen Bausteins des *tight junction* Komplexes, sichtbar gemacht wurden (helle Linien).

Ein weiterer Hinweis auf die Differenzierung der Alveolarzellen von einer Typ II zu einer Typ I Charakteristik ist die Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase, für das die Kultur am ersten Tag nach der Aussaat auf Transwell®-Filter positiv war. Am Kulturtag 6 konnte dagegen keine Alkalische Phosphatase mehr nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

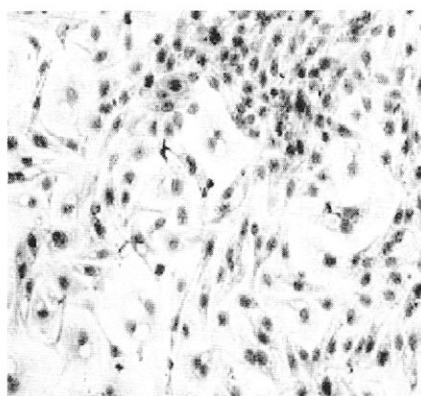


Abb. 4: Sechstägige Kultur von porcinen alveolaren Epithelzellen. Die Kerne des Präparates sind mit Hämatoxylin angefärbt. Neben kleinen abgerundeten Zellen erkennt man große Zellen mit flacher Morphologie.

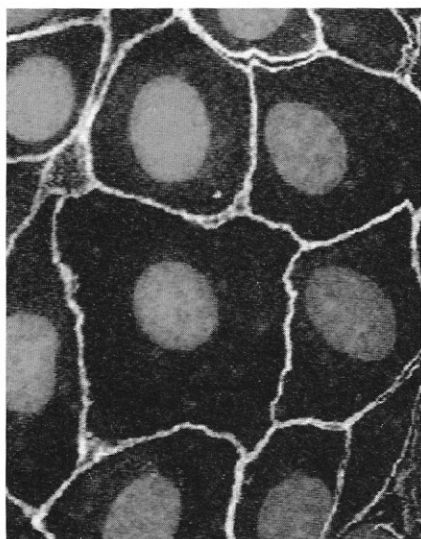


Abb. 5: Sieben Tage kultivierter Monolayer aus primären, porcinen Alveolarepithelzellen. Die hellen Banden zeigen die Anordnung der *tight junctions* zwischen den Zellen. Zur Anfärbung der TJ wurde ein fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper (ZO-1, Ratte, IgG) verwendet, der gegen das ZO-1 Protein gerichtet ist. Die Kerne der Zellen wurden mit Propidiumiodid gegengefärbt.

3.4 Vergleich der Barriereigenschaften unterschiedlicher *in vitro* Modelle

Die Charakterisierung der Dichtigkeit einer epithelialen Zellschicht geschieht üblicherweise über die Bestimmung von parazellulären Transportparametern (Hidalgo et al., 1989). Besonders einfach ist die Permeabilität der Zellschicht für Ionen zu verfolgen. Der transepitheliale elektrische Widerstand

korreliert in direktem Maße mit der Permeabilität des Zellmonolayers für anorganische Ionen und stellt eine sehr empfindliche Meßgröße für die Dichtigkeit von *tight junctions* ausbildenden Zellverbänden dar. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die elektrischen Widerstände verschiedener epithelialer Gewebe *in vivo* und *in vitro*. Aus den Daten (Literaturangaben bzw. eigene Messungen) wird die Variationsbreite der Meßwerte ersichtlich. Die an den verwendeten *in vitro* Modellen (fett gedruckt) gemessenen TEER-Werte liegen in einer mittleren Größenordnung, wobei die primären einen bis zu zehn Mal höheren TEER aufweisen wie Monolayer der Caco-2 Zelllinie.

Tab. 1: Elektrischer Widerstand verschiedener epithelialer Gewebe (unterschiedliche Spezies) im Vergleich. (1: Powell, 1981; 2: Crone and Olesen, 1982; 3: eigene Messung; 4: Dickinson, 1996; 5: Gitter, 2000)

Gewebe	Spezies	elektrischer Widerstand
Gallenblase	Kaninchen	20 (1) 310 (1)
(<i>in vivo</i>)	Molch	20 (1) 310 (1)
Magenschleimhaut		
(<i>in vivo</i>)	Molch	1730 (1)
Blase (<i>in vivo</i>)	Kaninchen	8700 (1)
Amphibienhaut (<i>in vivo</i>)	Frosch	5000-10000 (1)
Alveolarepithel (<i>in vivo</i>)	Ratte	> 1000 (4)
HAEC (Alveolarepithel <i>in vitro</i>)	Mensch	4000-5000 (3)
PAEC (Alveolarepithel <i>in vitro</i>)	Schwein	1000-2000 (3)
distales Kolonepithel (<i>in vivo</i>)	Maus	130-430 (5)
Caco-2 (Kolonkarzinomzelllinie)	Mensch	300-600 (3)
zerebrales Kapillarendothel (<i>in vivo</i>)	Frosch	1800 (2)
PBEC		
(zerebrales Kapillarendothel, <i>in vitro</i>)	Schwein	700-1500 (3)

Mehr als durch den TEER können die Barriereigenschaften verschiedener Modelle anhand der Permeabilität verschiedener Modellsubstanzen differenziert werden. Abbildung 6 zeigt die Permeabilität einer Reihe von Substanzen über Caco-2, PBEC-, PAEC- und HAEC-Monolayer. Dabei ist zu beachten, dass die an verschiedenen Modellen bestimmten absoluten Permeabilitätswerte einer Substanz nicht unmittelbar zueinander in Relation gestellt werden können. Aus diesem Grund wurden die gemessenen P_{app} -Werte auf den jeweiligen P_{app} -Wert von Fluorescein normiert. Fluorescein passiert alle Modelle mit annähernd gleicher Geschwindigkeit.

Auf eine Einteilung der Substanzen in Permeabilitätsklassen (was einen direkten Vergleich erlaubt) wurde hier verzichtet, da noch nicht für alle Modelle Permeabilitätsgrenzwerte definiert wurden. Ausschlaggebend ist hier das *Ranking* (Reihenfolge von hoher zu niedriger Permeabilität) der Substanzen, sowie das Verhältnis der Transportgeschwindigkeiten verschiedener Marker an einem einzelnen Modell.

Beim Vergleich des Markertransportes deuten sich für die verschiedenen Zellkulturmodelle unterschiedliche Permeationsprofile an. Im Falle des HAEC-Modells für das alveolare Epithel ist das *Ranking*

der Substanzen gegenüber Caco-2 und PBEC-Monolayern verändert, die Substanz AB6 tritt vergleichsweise langsam durch den HAEC-Layer. Der deutlichste Unterschied ist beim Transport von Rhodamin 123 erkennbar. Die Substanz wird über die Lungenmodelle mit ca. 10-fach bzw. 3,5-fach höherer Geschwindigkeit aufgenommen, als über Caco-2 und PBEC Monolayer. Die Transportgeschwindigkeit von Rhodamin 123 steht in engem Zusammenhang mit der Expression von Effluxproteinen, wie dem P-Glykoprotein, welches die Substanz erkennt und ausschleust. Noch deutlicher kann die Aktivität des P-Glykoproteins am Transport in die sekre-

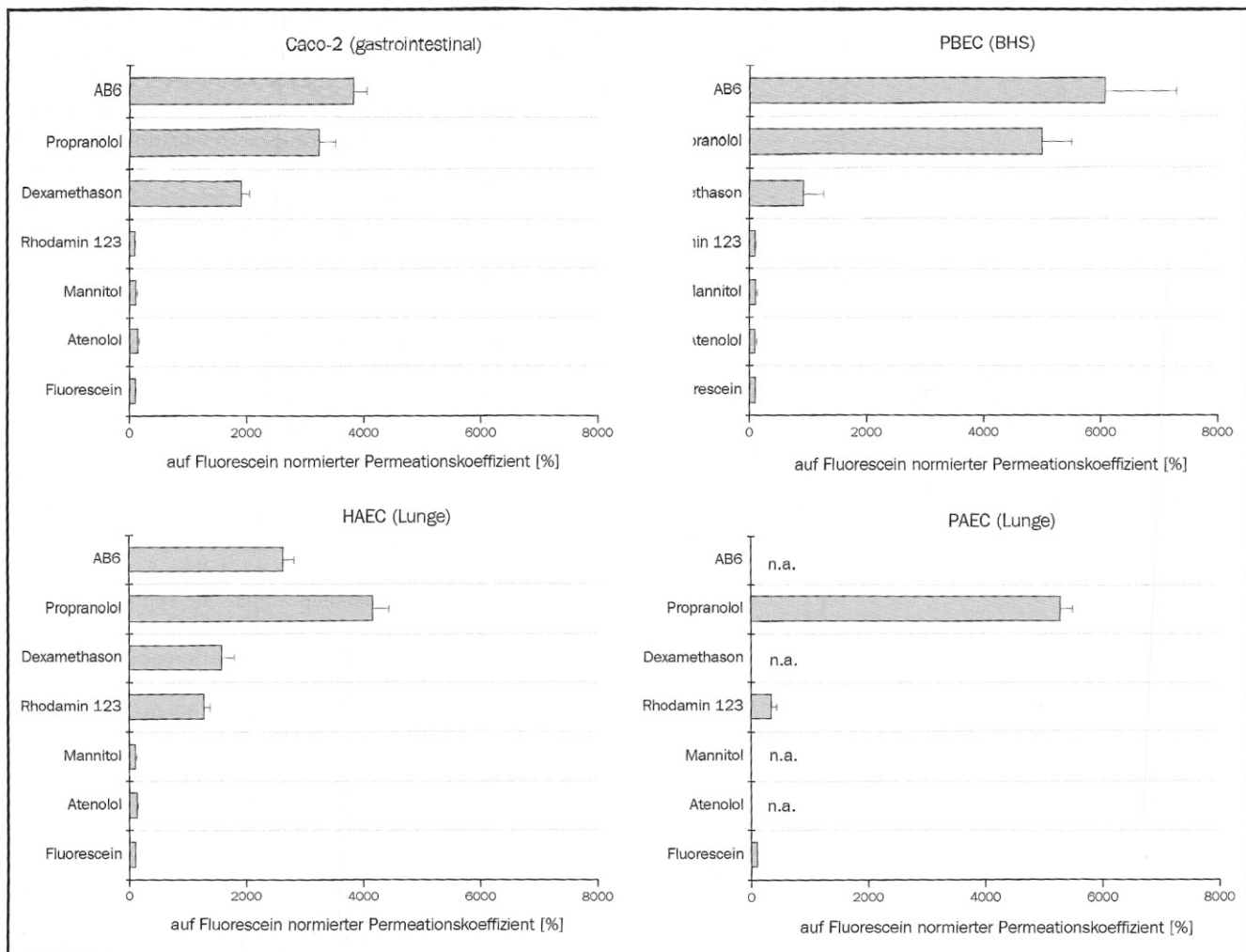


Abb. 6: Vergleich der Permeabilität (*apikal* > *basolateral*) von Modellschubstanzen an verschiedenen *in vitro* Modellen für die intestinale Mucosa, die Blut-Hirn Schranke sowie das Alveolarepithel. Die Papp-Werte wurden auf den Papp-Wert von Fluorescein normiert. Sie stellen typische Mittelwerte für die Permeabilität der Substanzen über das jeweilige Zellmodell dar (n.a.: nicht analysiert).

tive Richtung (von *basolateral* nach *apikal*) abgelesen werden (Abb. 7).

Die Aktivität der Effluxpumpe P-Glykoprotein (Pgp, MDR-1) wurde mit Hilfe des Substrates Rhodamin 123 untersucht. Der MDR-Phänotyp zeichnet sich durch einen erhöhten Substratefflux und somit durch eine verminderte Substratakkumulation in der Zelle aus. Im *in vitro* System ist der effektive Transport von Pgp-Substraten von *apikal* nach *basolateral* gegenüber Nicht-Substraten verlangsamt, während der Transport in die umgekehrte Richtung erhöht ist. Pgp-Inhibitoren vermindern diesen Effekt. Dies spiegelt sich in einer Annäherung der Permeationskoeffizienten für beide Transportrichtungen wider.

Der Transport von Rhodamin 123 zeigte am Caco-2 Modell die stärkste Asym-

metrie. Hier lag der P_{app} -Wert für den Transport von *basolateral* zu *apikal*er Seite des Monolayers um den Faktor 30-40 über dem P_{app} -Wert für die umgekehrte Transportrichtung. In geringerem Ausmaß konnte dieser Effekt auch für die PBEC-Monolayer (BHS) beobachtet werden. In Anwesenheit von P-Glykoprotein spezifischen Hemmstoffen wie Verapamil oder Ritonavir glichen sich die Permeationskoeffizienten für beide Transportrichtungen nahezu vollständig an. An den beiden Modellen HAEC und PAEC, welche das alveolare Epithel simulieren, konnte im Gegensatz zu den anderen Modellen keine deutliche Richtungsabhängigkeit des Rhodamin 123 Transportes beobachtet werden. Der P_{app} -Wert für beide Transportrichtungen war hier annähernd gleich.

4 Diskussion

Im Laufe der Evolution sind zahlreiche Mechanismen entstanden, die den menschlichen Organismus vor der Vielzahl von Fremdstoffen abschirmen, denen er tagtäglich ausgesetzt ist. Soll ein Pharmakon erfolgreich an seinen Wirkort gelangen, muß es diese biologischen Barrieren überwinden können. Zellkulturmodelle erweisen sich zunehmend als effiziente Werkzeuge zur Untersuchung biopharmazeutischer Eigenschaften, welche für die Entwicklung eines Wirkstoffs zu einem wirksamen Arzneimittel grundlegend sind.

Es steht außer Frage, dass weder ein Tiermodell noch ein Zellkultursystem alle Charakteristika der simulierten humanen Barriere vereinen kann. Die Eignungsprüfung eines Testsystems zur Permeabilitäts-

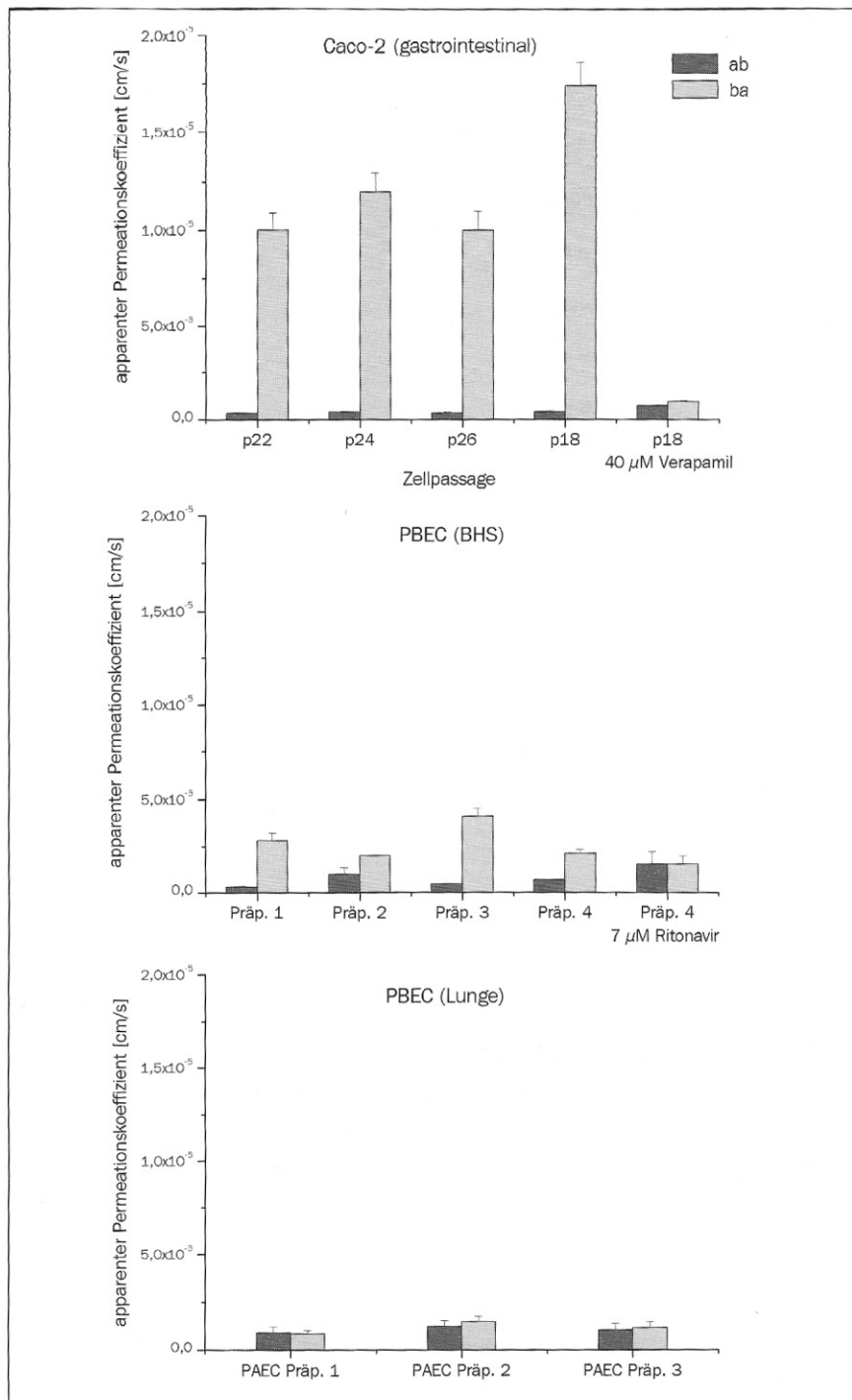


Abb. 7: Bidirektionaler Transport von Rhodamin 123 über die *in vitro* Modelle Caco-2, PBEC, PAEC und HAEC.

bestimmung muß jedoch möglichst viele Einflußfaktoren in Betracht ziehen, von denen bekannt ist, dass sie die Permeabilität *in vivo* beeinflussen können. Um physikalisch-morphologische sowie biochemische Charakteristika *in vitro* beizubehalten, ist es von Vorteil, wenn ein Modell aus dem Zelltyp besteht, der *in vivo*

wesentlich für die Barrierefunktion verantwortlich ist. Dabei kann es sich als praktikabler erweisen, verwandte Zell-species oder Vorläuferzellen zu isolieren, die in Kultur spontan differenzieren oder durch zusätzliche Faktoren zur (Um)differenzierung angeregt werden können. Caco-2 Zellen wurden ursprüng-

lich aus dem Kolon eines 76-jährigen Tumorpatienten isoliert. In Kultur bilden sie ohne Zugabe besonderer Differenzierungsfaktoren Zellschichten aus, die den säulenförmigen Dünndarm-Enterozyten morphologisch und enzymatisch ähnlicher sind als ihren Ursprungszellen. Wie das Dünndarmepithel *in vivo* bilden Caco-2 Zellen Mikrovilli aus, wodurch sich die resorbierende Oberfläche gewaltig vergrößert.

Alveolare Typ-I-Zellen sind dünn und flach. Sie haben dadurch eine große Kontaktfläche zum Wirkstoff bei gleichzeitig kurzer Diffusionsstrecke. Im *in vitro* Modell kann diese Morphologie nachgebildet werden. In Kultur können Typ-II-Zellen, die den Isolationsprozeß zu einem größeren Anteil überstehen, als die empfindlichen Typ-I-Zellen, zu flachen, ausgedehnten Zellen mit Typ I Charakteristik differenzieren. Auch die BHS Zellen (PBEC) weisen Differenzierungsmerkmale, wie das von Willebrandfaktor verwandte Antigen, auf, die für kapilläre Endothelzellen der BHS typisch sind.

Vergleicht man die hier beschriebenen PBEC Monolayer mit anderen in der Literatur beschriebenen BHS Modellen, so zeigt sich, dass die ermittelten Permeabilitäten für den *low permeability* Marker Saccharose mit Werten von $4,2 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ (für serumhaltiges Medium) bzw. $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ (für serumfreies Medium) mit zu den niedrigsten in der Literatur beschriebenen gehören. Sie liegen recht nahe an dem von Levin (1980) publizierten Meßwert von $0,12 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, der *in vivo* an adulten Ratten bestimmt wurde (Abb. 8).

Um die Leistungsfähigkeit eines Modells exakt einschätzen und die aus Permeabilitätsstudien gewonnene Information richtig deuten zu können, ist die Korrelation von *in vitro* und *in vivo* Daten mit Hilfe gut charakterisierter Modells-substanzen enorm wichtig. Problematisch ist dabei die Zugänglichkeit von *in vivo* Daten. Häufig liegen nur Daten zur absoluten Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes vor. Die Bioverfügbarkeit setzt sich jedoch ihrerseits aus vielen Einzelfaktoren zusammen. Genannt seien hier die ADME-Parameter (Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion), die nicht alle mit Hilfe eines Zellkultursystems simuliert werden können. Die Absorptionsgeschwindigkeit wiederum kann

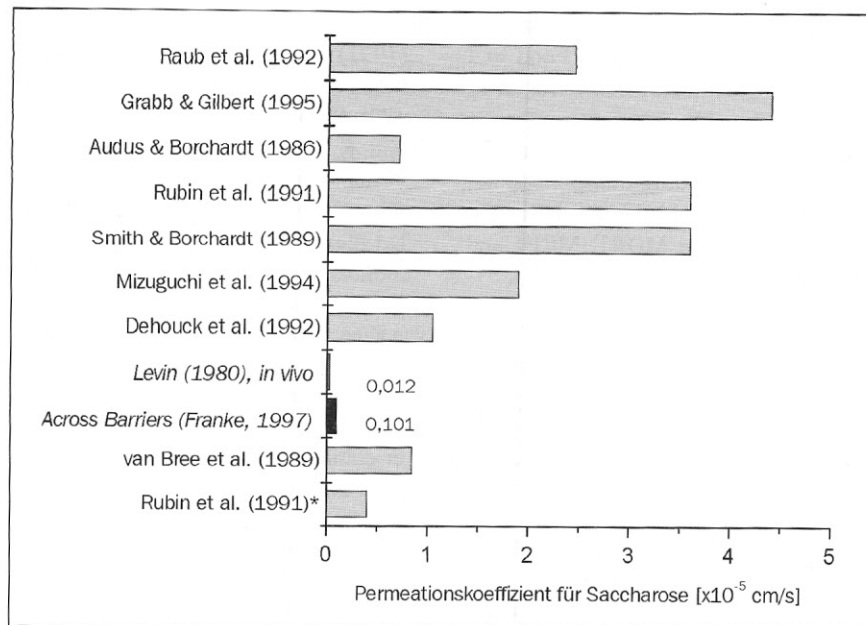


Abb. 8: Typische Saccharose-Permeabilitäten für verschiedene *in vitro* Modelle der Blut-Hirn Schranke im Vergleich zur BHS *in vivo*. Die Werte sind der Literatur entnommen. Da die Meßdaten in einigen Referenzen nicht in der allgemein gebräuchlichen Form als Quotient von Weg und Zeit angegeben waren, wurden diese zu Vergleichszwecken anhand weiterer Angaben der Autoren in die Einheit $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ umgerechnet (* nach Applikation von ACM und cAMP).

von Carrier- und Effluxproteinen beeinflusst werden. Mit Hilfe von spezifischen Substraten konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Caco-2 Zelllinie P-Glykoprotein überexprimiert (Collett et al., 1999). Andere Carrier, welche *in vivo* die Aufnahme von Dipeptiden, aber auch Arzneistoffen wie Amoxicillin vermitteln, werden dagegen unterexprimiert (Gres et al., 1998). Sind solche Abweichungen bekannt, können sie bei Prognosen der *in vivo* Verfügbarkeit einkalkuliert werden. Zu den genannten komplexen Wechselbeziehungen kommen nicht zuletzt individuelle Variationen, von denen immer mehr im Rahmen molekularbiologisch-pharmazeutischer Studien (*Pharmacogenomics/Pharmacoproteomics*) identifiziert werden.

Auch bei primären Zellmodellen können individuelle Unterschiede der Spenderorganismen, beispielsweise in der enzymatischen Ausstattung, zu Abweichungen in der Permeabilität einzelner Substanzen führen. Um diese Variationsbreite erfassen zu können, ist es unerlässlich, die Messungen an Zellen unterschiedlicher Herkunft zu reproduzieren. Ferner sollte auch für die primären Zellsysteme, wie bereits für das Caco-2 Modell dargestellt, mit Hilfe von Modellschubstanzen

eine Einteilung in Permeabilitätsklassen vorgenommen werden. Auf diese Weise lassen sich an unterschiedlichen Modellen bestimmte Permeabilitäten am sinnvollsten zueinander in Bezug setzen.

In vitro Testsysteme besitzen gegenüber Tierversuchen und Organkulturen den großen Vorteil, dass Permeabilitätsuntersuchungen bei hohem Durchsatz unter kontrollierten, reproduzierbaren Bedingungen durchgeführt werden können. Unter Umständen müssen zur Beantwortung bestimmter Fragestellungen verschiedene Modelle herangezogen werden. Hierin liegt aber auch das Potential, einzelne Faktoren gesondert untersuchen zu können und die gewonnenen Erkenntnisse in gezielte Strategien umzusetzen.

Zellkulturmodelle können Humanstudien nicht vollständig ersetzen, sie können jedoch viele Teilaspekte klären und so ganz wesentlich zu einem effektiveren Design und einer Verkürzung klinischer Studien beitragen. Die FDA-Richtlinie, die die Erteilung eines *Biowaivers* für Arzneimittel der BCS-Klasse I auf der Grundlage von *in vitro* Permeabilitätsstudien ermöglicht, hat kürzlich gezeigt, dass auf Zellkulturen basierende Ersatzmethoden auch zunehmend behördliche Akzeptanz finden.

Literatur

- Amidon, G. L., Gordon, L., Lennernäs, H. et al. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in-vitro* drug product dissolution and *in-vivo* bioavailability. *Pharmaceut. Res.* 12 (3), 413-420.
- Audus, K. L. and Borchardt, R. T. (1986). Characterization of the large neutral amino acid transport system of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *J. Neurochem.* 47, 484-451.
- Collett, A., Higgs, N. B., Sims, E. et al. (1999). Modulation of the permeability of H2 receptor antagonists cimetidine and ranitidine by P-glycoprotein in rat intestine and the human colonic cell line Caco-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288(1), 171-178.
- Crone, C., Olesen, S. P. (1982). Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res.* 241 (1), 49-55.
- Dickinson, P. A., Evans, J. P., Farr, S. J. et al. (1996). Putrescine uptake by alveolar epithelial cell monolayers exhibiting differing transepithelial electrical resistances. *J. Pharm. Sci.* 85, 1112-1116.
- Elbert, K. J., Schäfer, U. F., Schäfers, H. J. et al. (1999). Monolayers of human alveolar epithelial cells in primary culture for pulmonary absorption and transport studies. *Pharm. Res.* 16 (5), 601-8.
- Fogh, J., Fogh, J. M. and Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* 59, 221-226.
- Franke, H. (1997). *Die Blut-Hirn Schranke in-vitro: Etablierung eines Zellkulturmodells zur Prüfung der Hirngängigkeit von Pharmaka*. Dissertation, Westfälische Wilhelmsuniversität Münster.
- Gitter, A. H., Bendfeldt, K., Schulzke, J. D. and Fromm, M. (2000). Trans/paracellular, surface/crypt, and epithelial/subepithelial resistances of mammalian colonic epithelia. *Pflügers Arch.* 439 (4), 477-482.
- Grabb, P. A. and Gilbert, M. R. (1995). Neoplastic and pharmacological influence on the permeability of an *in-vitro* blood-brain barrier. *J. Neurosurg.* 82, 1053-1058.

- Gres, M. C., Julian, B., Bourrie, M. et al. (1998). Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharm. Res.* 15 (5), 726-733.
- Gumbiner, G. L. (1993). Breaking through the tight junction barrier. *J. Cell. Biol.* 123 (6), 1631-1633.
- Haltner, E., Schmitz, S., Gindorf, C. and Ruoff, J. (2001). In vitro permeability studies as a substitute for in vivo studies-which requirements have to be met. *ALTEX*, 18(1), 81-87.
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J. and Borchardt, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96 (3), 736-749.
- Hunter, J., Hirst, B. H. and Simmons, N. L. (1993). Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Pharm. Res.* 10 (5), 743-749.
- Hussein, A. (2000). *Guidance for Industry: Waiver of in-vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system*. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.
- Kerb, R., Hoffmeyer, S. and Brinkmann, U. (2001). ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* 2 (1), 51-64.
- Levin, V. A. (1980). Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J. Med. Chem.* 23, 682-684.
- Madara, J. L. (1988). Tight junction dynamics: is paracellular transport regulated? *Cell* 53(4), 497-498.
- Mizuguchi, H., Hashioka, Y., Utoguchi, N. et al. (1994). A comparison of drug transport through cultured monolayers of bovine capillary and bovine aortic endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1385-1390.
- Powell, D. W. (1981). Barrier function of epithelia. *Am. J. Physiol.* 241, G275-G288.
- Raub, T. J., Kuentzel, S. L. and Sawada, G. A. (1992). Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in-vitro: Barrier tightening by a factor released from astroglia cells. *Exp. Cell. Res.* 199, 330-340.
- Rubin, L. L., Hall, D. E., Porter, S. et al. (1991). A cell culture model for the blood-brain barrier. *J. Cell. Biol.* 115, 1725-1735.
- Smith, K. R. and Borchard, R. T. (1989). Permeability and mechanism of albumin, cationized albumin and glycosylated albumin transcellular transport across monolayers of cultured bovine brain capillary. *Pharm. Res.* 6, 446-473.
- van Bree, J. B. M. M., de Boer, A. G., Danhof, M. et al. (1988). Transport of vasopressin fragments across the blood-brain barrier: in-vitro studies using monolayer cultures of bovine brain endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249, 901-905.
- Wacher, V. J., Salphati, L., Benet, L. Z. (2001). Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 46 (1-3), 89-102.

Korrespondenzadresse

Across Barriers GmbH
 Dr. Eleonore Haltner
 Science Park Saar
 Postfach 15 11 61
 D-66123 Saarbrücken
 Tel.: +49-681 959188 00
 Fax: +49-681 959188 02
 E-mail: info@acrossbarriers.de
 www.acrossbarriers.de

