

In vitro Modelle von Darm- und Lungen-Gewebekulturen in der pharmazeutischen Forschung

Claus-Michael Lehr

Universität des Saarlandes, D-Saarbrücken

Zusammenfassung

Die Fortschritte der modernen Bio- und Informationstechnologie haben starke Auswirkungen auf die Entwicklung neuer Arzneimittel: Auf der einen Seite ermöglichen es computerunterstützte Synthese- und Screeningverfahren, immer mehr potentielle Arzneistoffe auf chemischen Wege herzustellen; auf der anderen Seite nimmt die Zahl der biotechnologisch hergestellten Arzneistoffe (Peptide, Proteine, Antisense-Oligonukleotide, Vetoren für die somatische Gen-Therapie) ständig zu. Ob sich aus diesen Molekülen wirksame und sichere Arzneimittel entwickeln lassen, hängt u.a. stark davon ab, ob diese Wirkstoffe ihren Zielort (Rezeptor) innerhalb des Körpers auch tatsächlich erreichen. Häufig können biologische Barrieren, wie etwa die Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes, von den Arzneistoffmolekülen nicht überwunden werden. In vitro Testsysteme auf der Basis menschlicher epithelialer Zellkulturen können helfen, unter den möglichen Arzneistoffkandidaten diejenigen auszuwählen, welche problemlos absorbiert werden. Darüber hinaus sind solche Zellkultursysteme hilfreich bei der Suche nach neuen Applikationswegen für diejenigen Arzneistoffe, welche normalerweise nicht oral appliziert werden können. In diesem Zusammenhang gewinnt auch die pulmonale Applikation von Arzneistoffen und die Entwicklung von Zellkulturmodellen der alveolaren Blut-Luft-Schranke zunehmend an Interesse.

Summary: In vitro intestinal and alveolar epithelium cultures in drug research

The progress of modern bio- and information-technology has made an enormous impact on the development of new drugs: At the one hand, computer-aided drug design and automated high-throughput screening has enormously facilitated the chemical synthesis of new drug candidates. At the other hand, the number of macromolecular biopharmaceuticals, such as peptides, proteins, antisense agents or gene vectors is continuously increasing. Whether or not such new entities can indeed be developed to safe and efficient medicines, is largely determined by the question, whether these molecules are able to reach their actual target (receptor) within the patient's body. Often, biological barriers, such as the mucosal epithelium of the gastrointestinal tract cannot be passed. In vitro test systems based on human epithelial cells may help to determine those candidate drugs which are well absorbed after oral application. Moreover, such cell culture models are helpful tools for the discovery for new delivery routes for those molecules, which cannot be administered by oral application. In this context, there is an increasing interest in the pulmonary delivery of drugs, as well as in the development of cell culture systems to model the blood-air barrier represented by the alveolar epithelium.

Keywords: 3R, Caco-2 cells, drug development, human epithelial cells, intestinal and alveolar epithelium, blood-air barrier

1 Auswirkungen der Bio- und Informationstechnologie auf die Entwicklung neuer Arzneimittel

Die Entwicklung neuer Arzneimittel erfährt durch die imponierenden Fortschritte auf den Gebieten der Bio- und Informationstechnologie derzeit wichtige neue Impulse. Auf der einen Seite ermöglichen es neuartige Methoden des *Computer-aided Drug Design*, der kombinatorischen Chemie sowie pharmakologische Testmethoden mit hoher Durchsatzkapazität (*high-throughput screening*), daß inner-

halb relativ kurzer Zeit und in einem Arbeitsgang 100.000 und mehr neue Arzneistoffmoleküle synthetisiert und auf ihre potentielle Wirksamkeit getestet werden können. Auf der anderen Seite kommen zu diesen, mit modernen Methoden identifizierten „konventionellen“ Arzneistoffen (d.h. relativ kleine Moleküle organisch chemischer Herkunft) in zunehmendem Maße echte „Biopharmazeutika“, also makromolekulare Arzneistoffe biotechnologischer Herkunft. Damit gemeint sind zunächst Peptide und Proteine, aber auch Oligonukleotide zur Modulation der Gen-

Expression, bis hin zu DNA-Vektoren für eine mögliche *in-vivo* Genterapie.

Während die modernen Synthesemethoden und Wirksamkeitstests inzwischen zu einer enormen Zunahme an *potentiellen* Wirkstoffkandidaten (strenggenommen sind dies zunächst nichts anderes als Liganden mit einer hohen Rezeptoraffinität) geführt haben, herrscht noch immer ein Mangel an adäquaten Methoden, um die wichtigen biopharmazeutischen Eigenschaften, insbesondere die Permeabilität über Absorptionsbarrieren, mit einer dem neuen Stoffangebot angemessenen Kapazität zu

untersuchen. Es liegt auf der Hand, dass von zwei gleich potenten Arzneistoffen letztlich derjenige ein erfolgreicherer Produkt abgegeben wird, der oral (z.B. als Tablette oder Kapsel) und nicht parenteral oder nur über ein kompliziertes und teures „*Delivery System*“ angewandt werden kann.

Vor diesem Hintergrund kommt modernen Zellkulturverfahren eine wachsende Bedeutung im Entwicklungsprozess neuer Arzneistoffe zu. Sie erlauben es, von einer relativ großen Anzahl an Substanzen wichtige Permeabilitätsdaten zur Vorhersage der Absorption bereits in einer sehr frühen Entwicklungsphase zu erhalten. Außerdem hilft dieser Ansatz, Tierversuche zu vermeiden. Eine neue *Guideline* der FDA (Hussain, 1999) sieht außerdem vor, beim Vorliegen geeigneter Permeabilitäts- und Löslichkeitsdaten von Arzneistoffen, bei der Zulassung von Arzneimitteln mit rascher Wirkstofffreisetzung auf klinische Bioäquivalenzstudien zu verzichten

Noch größer wird die Problematik des Barrieretransports bei den „echten“ Biopharmazeutika. Aufgrund ihrer Größe, ihrer schlechten Lipidlöslichkeit und geringen metabolischen Stabilität bereitet der Transport solcher Moleküle vom Applikations- zum Wirkort von Natur aus große Probleme. Die für Arzneimittel grundsätzlich bevorzugte orale Applikation scheidet in der Regel aus, aber auch nach intravenöser Applikation können Peptide und Proteine z.B. kaum in das zentrale Nervensystem gelangen, weil sie die sog. Blut-Hirn-Schranke normalerweise nicht überwinden. Noch schwieriger gestaltet sich die Überwindung solcher biologischer Barrieren bei der sog. Gentherapie, wo selbst nach direkter Injektion ins Zytoplasma nur etwa eines von 100.000 Plasmid-Molekülen in den Nukleus transportiert und erfolgreich transkribiert wird. Die Erforschung neuer Technologien, welche den sicheren und effizienten Transport zum eigentlichen Wirkort gewährleisten, ist gerade für diese hochpotenten, aber leider mit äußerst unvorteilhaften pharmakokinetischen Eigenschaften behafteten Makromoleküle sehr wichtig.

2 Transport- und Barrierenfunktionen epithelialer Schleimhautgewebe

Der schematische Aufbau eines einschichtigen Epithels, wie z.B. das des Dün-

darms, ist in Abbildung 1 gezeigt. Gleichzeitig enthält diese Abbildung auch alle wesentlichen (nicht auf Arzneistoffe beschränkten!) Transportwege zwischen der apikalen (= dem Darmlumen zugewandten) und der basolateralen (= der Serosa bzw. den Blutgefäßen zugewandten) Seite einer solchen biologischen Barriere.

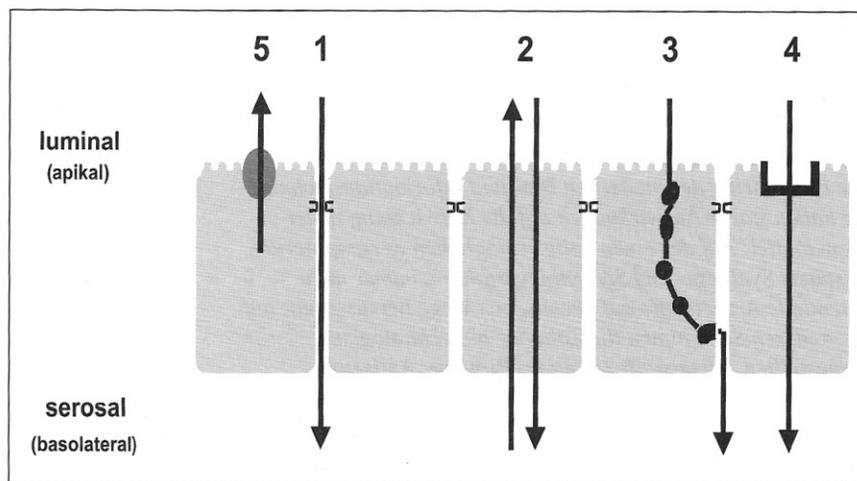


Abbildung 1: Transportwege an einer epithelialen Barriere: 1 = parazellulär, 2 = transzellulär, 3 = vesikulär (Endo-/Transzytose), 4 = Transporter-vermittelt, 5 = apikales Efflux-System.

Die meisten Arzneistoffe, insbesondere jene, die derzeit als Arzneimittel zur oralen Anwendung zugelassen und im Handel sind, werden über passive, transzelluläre Diffusion (Weg 2) absorbiert. Dies ist jedoch nur für relativ kleine Moleküle möglich, die hinreichend schnell durch die lipoidalen Zellmembranen diffundieren und überdies hinreichend lipid- und wasserlöslich sein müssen. Einige Arzneistoffe (z.B. bestimmte Antibiotika) werden über spezifische *Carrier-Systeme* (Weg 4) transportiert, teilweise sogar aktiv, d.h. unter Verbrauch von ATP. Mit dem Verfügbarwerden geeigneter zell- und molekularbiologischer Untersuchungsmethoden werden derzeit mehr und mehr relevante *Carrier-Systeme* entdeckt und charakterisiert. Es ist jedoch festzuhalten, dass wahrscheinlich keines dieser Transportsysteme für die Absorption großer Moleküle, wie z.B. biopharmazeutische Arzneistoffe, geeignet ist.

Neben ihrer Wirkung als physikalische Diffusionsbarriere wirken epitheliale Zellverbände aber auch als eine biochemische bzw. metabolische Barriere. Während man Probleme bei der oralen Bioverfügbarkeit früher häufig mit einer raschen Metaboli-

sierung in der Leber (*first-liver-pass effect*) in Verbindung brachte, setzt sich inzwischen mehr und mehr die Einsicht durch, dass derartige Prozesse bereits zum großen Teil in der Darmwand selbst ablaufen. Besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang einerseits metabolischen Enzymen, andererseits sog. apika-

len Efflux-Systemen zu. Als metabolische Enzyme sind die P450 Monooxygenasen der Leber schon seit langem bekannt. Neuere Untersuchungen geben jedoch deutliche Hinweise darauf, dass solche Enzymaktivitäten schon in der Darmmucosa zu einer entsprechenden Metabolisierung von Arzneistoffen führt. Im Darmepithel ist vor allem das zur P450-Klasse gehörende Enzym CYP 3A4 von Bedeutung.

Apikale Efflux-Systeme hingegen transportieren Arzneistoffe gezielt aus der Zelle hinaus. Bekannt ist dieses Phänomen schon seit längerem als *multi drug resistance* (MDR)-Phänomen von Tumorzellen, welches deren Behandlung mit Zytostatika erheblich erschwert. Ist ein solches Transportsystem auf der apikalen Seite von polarisierten Epithelzellen lokalisiert, so bewirkt dies einen gerichteten Transport der betreffenden Substrate in *sekretorischer* Richtung, also von der basolateralen zur apikalen Seite. Sofern ein Arzneistoff ein Substrat für ein derartiges Efflux-System ist, wird demzufolge der Transport in absorptiver Richtung (also von apikal nach basolateral) entsprechend gehemmt, und es kommt zu einer stark verminderten bzw. variablen Bioverfüg-

barkeit. Von den verschiedenen Efflux-Systemen kommt vor allem dem sog. P-Glykoprotein eine besondere Bedeutung als Absorptionsbarriere zu. Neben der bekannten Problematik bei der Chemotherapie von Tumoren und seiner inzwischen erkannten Bedeutung als biochemische Absorptionsbarriere an der Darmschleimhaut scheint dieses Efflux-System auch für den häufig problematischen Transport von Arzneistoffen in das zentrale Nervensystem über das Kapillarendothel der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich zu sein.

3 *In vitro* Testsysteme auf der Basis (menschlicher) Epithelzellen

Um die im Zusammenhang mit der Entwicklung von Arzneimitteln bedeutsamen Transportprozesse an epithelialen Geweben unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen, stehen seit etwa 10 Jahren einige, inzwischen recht gut charakterisierte Testsysteme auf der Basis von Zellkulturen zur Verfügung. Aus naheliegenden Gründen werden dabei humane Zellen des betreffenden Organs bevorzugt, aber auch an Epithelzellen von anderen

Spezies oder Organen können nützliche Daten gewonnen werden. Unterschieden werden muß ferner, ob es sich bei dem jeweiligen Zellkultursystem um primäre Zellen oder um eine Zelllinie handelt. Primäre Zellen haben den Vorteil, daß sie die typischen Eigenschaften *normaler* Zellen oft besser repräsentieren, müssen aber aus Biopsiematerial frisch gewonnen werden und lassen sich nur wenige Male oder gar nicht passagieren. Demgegenüber haben Zelllinien den Vorteil, daß sie aufgrund ihrer Unsterblichkeit praktisch unbegrenzt vermehrt und somit auch bevorratet werden können. Dem steht allerdings der Nachteil gegenüber, daß durch die Immortalisierung bzw. wegen des Tumorcharakters oft eine mehr oder weniger starke Entdifferenzierung gegenüber normalen Zellen in Kauf genommen werden muß.

Um Transportuntersuchungen von Arzneistoffen mit relativ kleinen Substanzmengen bzw. mit adäquatem Probenumsatz durchführen zu können, sind im Handel verschiedene Systeme erhältlich. Ausgangspunkt bildet dabei immer eine Filtermembran, die an einem passend geformten Einsatz (engl. „insert“) befestigt ist, welcher wiederum in die Vertiefungen („wells“) von normierten Mikrotiterplatten passt (Abb.2). Auswahlmöglichkeiten, die es sich bei der Etablierung eines bestimmten *in vitro* Modells zu vergleichen lohnt, bestehen hinsichtlich des Materials, der Größe und möglicher Oberflächenbehandlungen bzw. Beschichtungen der Filter.

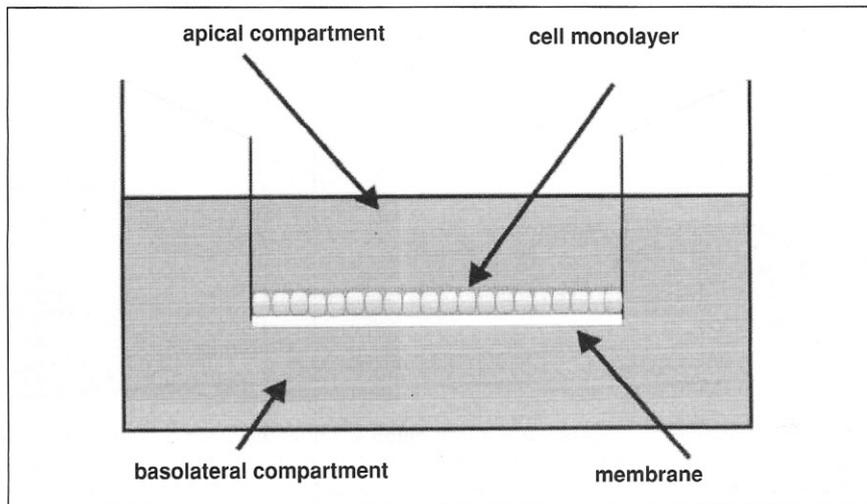


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Versuchsanordnung zur Kultivierung und Durchführung von Transportversuchen an künstlichen Epithelien. Typischerweise sind mehrere solcher Systeme in den Kavitäten handelsüblicher Mikrotiterplatten angeordnet.

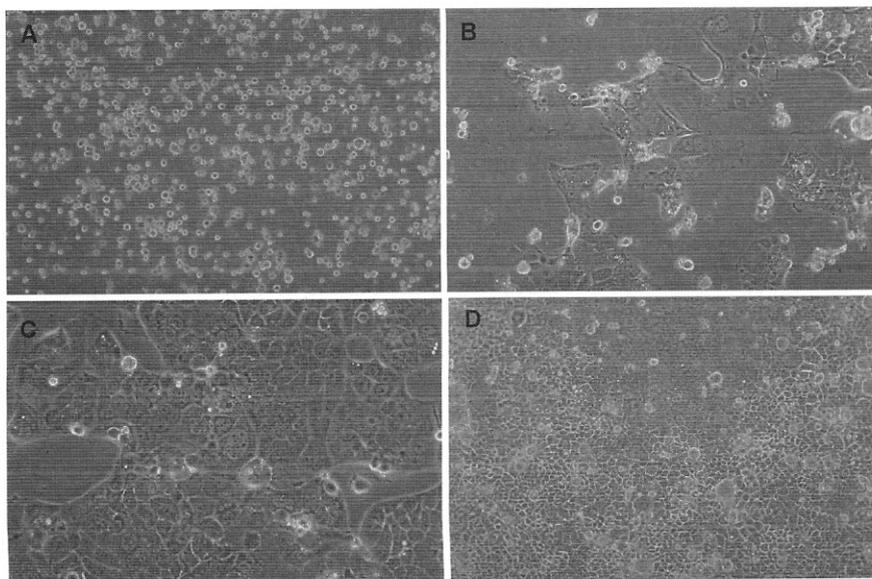


Abb. 3: Caco-2 Zellen in verschiedenen Wachstumsstadien; A: einzelne, noch runde Zellen frisch nach der Aussaat, B: Beginnende Teilung und Adhäsion auf dem Substrat (ca. 3 Tage alt), C: semi-konfluentes Stadium (ca. 7 Tage nach der Aussaat), D: konfluenten Monolayer (ca. 10 Tage nach der Aussaat).

3.1 Die Caco-2 Zelllinie zur Untersuchung der Absorption von Arzneistoffen über den Dünndarm

Das für pharmazeutische Permeabilitätsuntersuchungen wohl am weitesten verbreitete und bekannteste epitheliale Zellkultursystem dürfte derzeit die Caco-2 Zelllinie sein. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die in den 70er Jahren durch den dänischen Arzt Fogh von einem Colon Carcinom (Name!) eines 76 Jahre alten Patienten isoliert und charakterisiert wurde (Fogh et al., 1977). Im Unterschied zu vielen anderen Darmtumorzelllinien hat Caco-2 trotz ihrer Immortalität die Fähigkeit bewahrt, auf festen Substraten anzuwachsen und dabei einen konfluenten Zellverband zu bilden, welcher große morphologische und physiologische Ähnlichkeit zum normalen Dün-

darmepithel des Menschen aufweist. Wichtige Merkmale sind dabei insbesondere die Ausbildung funktionsfähiger *tight junctions*, sowie die Expression charakteristischer Enzyme und Transportsysteme (z.B. P-Glykoprotein, Cytochrom P450 3A4, Vit.B12 Transporter u.a.). Die grundsätzliche Eignung der Caco-2 Zelllinie als *in vitro* Modell zur Untersuchung des Transports von Arzneistoffen wurde Ende der 80er Jahre publiziert (Hidalgo et al., 1989). Die in der folgenden Zeit von vielen Arbeitsgruppen gefundene gute Korrelation zwischen an solchen Zellmonolayern gewonnen Permeabilitätsdaten und der oralen Absorptionsquote von Arzneistoffen führte dazu, daß das Caco-2 Modell in viele Labors der pharmazeutischen Industrie Eingang fand. Wie eingangs erwähnt, hat inzwischen sogar die amerikanische Zulassungsbehörde FDA eine sog. *Guideline* publiziert, in der im Zusammenhang mit dem sog. „*Biopharmaceutics Classification System* (BCS)“ die Bestimmung der intestinalen Permeabilität anhand von validierten Zellkultursystemen vorgesehen ist (Hussain, 1999). Auf der Grundlage solcher *in vitro* Daten ist in bestimmten Fällen ein Verzicht auf Bioverfügbarkeits/Bioäquivalenz (BA/BE)-Studien möglich („*Biowaiver*“). Demnach dürften in Zukunft Permeabilitätsstudien an epithelialen Zellmonolayern nicht nur für das frühe Screening neuer Arzneistoffkandidaten, sondern auch im Rahmen der Zulassung von Arzneimitteln erheblich an Bedeutung gewinnen.

In Abbildung 3 ist der Wachstums- und Differenzierungsprozess von Caco-2 Zellen im Abstand von mehreren Tagen dargestellt. Man erkennt, wie sich die nach der Trypsinisierung zunächst rundliche Zellen am Boden des Substrats anheften und spreiten, sich dabei weiter teilen und schließlich – nach normalerweise ca. 10-12 Tagen – einen konfluenten Monolayer bilden, in dem sich keine „Löcher“ mehr befinden.

Das in Abbildung 4 gezeigte mikroskopische Querschnittsbild eines ausdifferenzierten Caco-2 Monolayers zeigt, daß die Zellen inzwischen eine typische säulenartige Form angenommen haben und einen einschichtigen, dichten Zellverband bilden. An der Apikalseite der Zellen ist der Bürstensaum der Mikrovilli erkennbar. Die große Ähnlichkeit zu den Ver-

hältnissen *in vivo* wird durch die rechte Abbildung verdeutlicht, welche einen Querschnitt in ähnlicher Vergrößerung vom Dünndarm des Schweines zeigt. Gleichzeitig erinnert dieses Bild auch an einen wichtigen Unterschied zwischen einer künstlichen „Caco-2 Schleimhaut“ und dem „echten“ Darmepithel: Da es sich bei den Caco-2 Zellen um eine Monokultur einer einzigen Zelllinie handelt, fehlen die Schleim-produzierenden Becherzellen. Mögliche Wechselwirkungen von Arzneistoffen oder pharmazeutischen *Carrier*-Systemen mit dem Mucus, dem in bestimmten Fällen durchaus auch die Rolle einer weiteren biologischen Barriere zukommen kann, bleiben im Caco-2 Modell also unberücksichtigt.

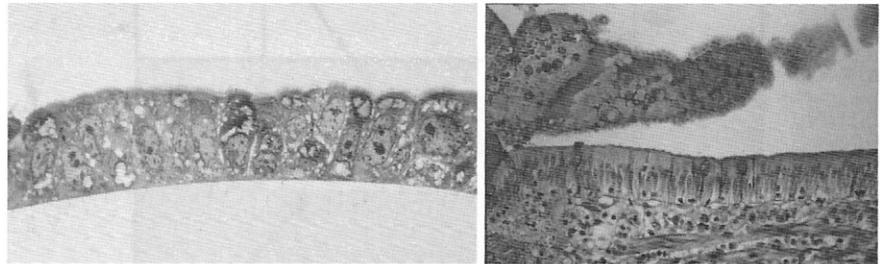


Abb. 4: Mikroskopischer Querschnitt durch einen konfluenten Caco-2 Monolayer, angezchtet auf einer permeablen Filtermembran (links) sowie durch die normale Dünndarmmucosa des Schweines (rechts); weitere Erklärungen im Text.

3.2 Humane alveolare Epithelzellen zur Untersuchung der pulmonalen Absorption von Arzneistoffen

Obwohl die orale Applikation eines Arzneimittels bei weitem bevorzugt wird, ist diese für makromolekulare Arzneistoffe biotechnologischen Ursprungs (Peptide, Proteine etc.) bis jetzt im allgemeinen nicht möglich. Um dem Patienten trotzdem die unangenehme Injektion zu ersparen, sucht man nach Alternativen. Hierbei hat sich vor allem die inhalative Applikation von Protein-Arzneistoffen, wie z.B. insbesondere Insulin, als sehr vielversprechend erwiesen. Mehrere Präparate dieser Art befinden sich derzeit in fortgeschrittenen Phasen der klinischen Prüfung, und ihre Zulassung bzw. Markteinführung dürfte in Kürze erfolgen.

Die Inhalation von Arzneistoffen ist im Zusammenhang mit Atemwegserkrankungen, wie z.B. Asthma, schon seit langem üblich. Das Ungewöhnliche an der inhalativen Applikation von Insulin und anderen Peptidhormonen ist – abgesehen von der anderen chemischen Struktur und

Größe derartiger Moleküle –, daß die Lunge nicht selbst Ziel der Behandlung ist, sondern lediglich als Zugangsweg genutzt wird, um Arzneistoffe dem ganzen Organismus (systemisch) zur Verfügung zu stellen. Wie weit dieser Weg von Patienten und Ärzten akzeptiert wird, kann nur die Zukunft zeigen. Es ist aber klar, daß in diesem Zusammenhang unser Wissen um die Transportvorgänge an den biologischen Barrieren der Lunge („Blut-Luft-Schranke“) ebenfalls immer wichtiger wird. Die Schleimhaut der Lunge zeichnet sich zunächst durch eine sehr große Oberfläche von etwa 140 m² aus und wird, ausgehend von der Luftröhre über die Bronchien und Bronchiolen, immer dünner, bis ihre Dicke schließlich im

Bereich der Alveolen weniger als 1 µm beträgt. Durch diese hauchdünne Barriere erfolgt der rasche Austausch der Atemgase. Vermutlich werden Proteine ebenfalls im Bereich des Alveolarepithels absorbiert. Die dazu beitragenden speziellen Transportvorgänge (z.B. über sog. „*Caveolae*“) sind allerdings noch weitgehend unerforscht.

Abbildung 5 zeigt schematisch die unterschiedlichen Größen- bzw. Dickenverhältnisse der säulenartigen Epithelzellen des Dünndarms oder der Atemwege (links) und den hauchdünnen Plattenepithelzellen der Alveolarschleimhaut (rechts). Abbildung 6 zeigt das Epithel eines einzelnen Lungenbläschens, wie dieses im aufgeklappten Zustand erscheinen würde. Den größten Teil der Oberfläche machen dabei die großflächigen, dünnen Typ-1 Zellen aus, zwischen denen sich die kleineren und mehr rundlich geformten Typ-2 Zellen befinden. Letztere machen zwar nur einen kleinen Teil der Schleimhaut-Oberfläche aus, sie sind aber dafür zahlreicher als die Typ-1 Zellen. Da vermutlich die Typ-1

Zellen für die Transportvorgänge am Alveolarepithel besonders wichtig sind, ist man vor allem daran interessiert, diese ggf. *in vitro* als Monolayer zu züchten.

Da sich die filigranen Typ-1 Zellen aber kaum unzerstört isolieren lassen, muß man dazu einen Umweg beschreiten. Ausgehend von humanem Biopsiematerial werden zunächst daraus die Typ-2 Zellen isoliert und ausgesät. Unter geeigneten Kulturbedingungen nehmen diese jedoch Typ-1-ähnliche Eigenschaften an, d.h. sie verändern ihre Form und entwickeln dichte Zell-Zell-Verbindungen („tight junctions“) (Abb. 7).

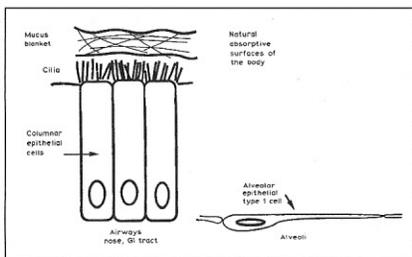


Abb. 5: Relative Größenverhältnisse des Säulenepithels von Luftwegen, Nase und Gastrointestinaltrakt (links) und dem Plattenepithels alveolarer Typ-1 Zellen (rechts) (nach (Patton J.S. and Platz R.M., 1992)).

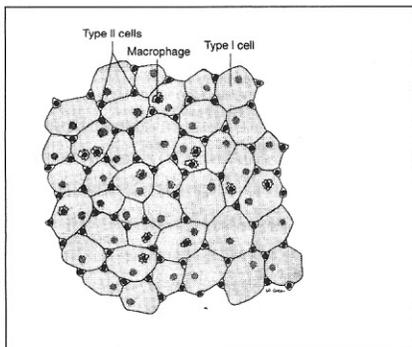


Abb. 6: Würde man ein einzelnes Lungenbläschen flach ausbreiten, so könnte seine innere Oberfläche so aussehen. Ein durchschnittliches menschliches Lungenbläschen hat eine Oberfläche von 206 900 µm² und ist von 40 Typ-1 und 67 Typ-2 Zellen bedeckt. (nach (Patton J.S., 1996)).

Die Ausbildung eines kontinuierlichen tight-junction-Gürtels bewirkt einen hohen transepithelialen Widerstand und ist für die Ausbildung der biologischen Barrierefunktion sehr wichtig. Wie erste Untersuchungen zeigen, ist es mit Hilfe einer solchen Primärkultur von humanen alveolaren Epithelzell-Monolayern möglich, bestimmte Markermoleküle hinsicht-

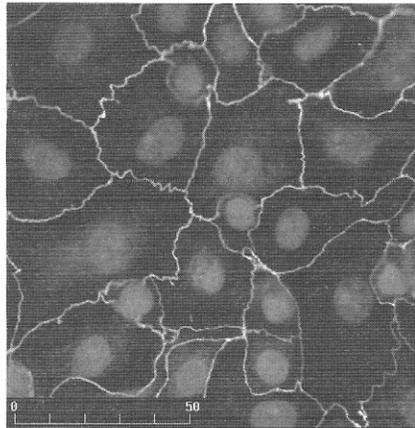


Abb. 7: Humaner alveolarer Zellmonolayer in Primärkultur. Die ursprünglich isolierten Typ-2 Zellen haben zum größten Teil eine großflächige und flache Form angenommen, welche den Typ-1 Zellen entspricht. Wichtig ist außerdem der kontinuierliche tight-junction Gürtel zwischen den Zellen, welcher hier durch einen spezifischen Antikörper gefärbt und als helle Linie erkennbar ist (aus (Elbert et al. 1999)).

lich ihrer Transporteigenschaften zu unterscheiden und zu charakterisieren. Zuvor in der Literatur beschriebene alveolare Zelllinien erwiesen sich dazu als nicht geeignet. Somit ist der erste Schritt für die Entwicklung eines neuen *in vitro* Modells getan, welches zur Untersuchung der Transportmechanismen von Arzneistoffen an der Blut-Luft-Schranke, sowie zur Vorhersage der systemischen Absorption inhalativ applizierter Arzneistoffe dienen kann. Wie auch im Falle der für die Darmschleimhaut bereits länger etablierten Zellkulturmodelle, liessen sich dadurch bei der Entwicklung und Zulassung neuer inhalativer Arzneimittel, deren Bedeutung in Zukunft vermutlich stark zunehmen wird, Tierversuche und klinische Prüfungen am Menschen vermeiden bzw. reduzieren. Als nächster Schritt in diese Richtung ist es einerseits erforderlich, das vorhandene Primärkultur-Modell weiter zu charakterisieren und zu standardisieren. Um langfristig die Durchsatz-Kapazität zum Screenen einer größeren Zahl an neuen Arzneistoff-Kandidaten erzielen zu können, wäre es wünschenswert, diese Zellen zu immortalisieren. Dadurch könnte man zu einer neuen humanen Zelllinie gelangen, welche die wichtigen Transport- und Barriereigenschaften der Blut-Luft-Schranke stabil exprimiert.

Literatur

- Elbert, K. J., Schäfer, U., 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), 601-608.
- Fogh, J., Fogh, J. M. and Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59, 221-226.
- Hidalgo, I., Raub, T. and Borchardt, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 98, 736-749.
- Hussain, A. (1999). *Guidance for Industry; Waiver of in-vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms containing certain active moieties/active ingredients based on a biopharmaceutics classification system.* Rockville, MD, USA: FDA.
- Patton, J. S. (1996). Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Adv. Drug Delivery Rev.* 19, 3-36.
- Patton, J. S. and Platz, R. M. (1992). Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action. *Adv. Drug Delivery Rev.* 8, 179-196.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Claus-Michael Lehr
 Fachrichtung Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie
 Universität des Saarlandes
 D-66123 Saarbrücken
 Tel. + 49-681-302 30 39
 Fax + 49-681-302 46 77
 E-mail: lehr@rz.uni-sb.de
<http://www.uni-sb.de/fak8/lehr/>