

## Ersatzmethoden zum Tierversuch:

Seit 15.09.2001 geförderte Projekte und Verbundprojekte

### **Verbundprojekt: Validierungsstudie zur Prüfung auf Hautpenetration mit Hilfe von biotechnologisch hergestellten Hautmodellen - (Phase 1), Teilprojekte 1 – 6**

**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0312881; 0312882; 0312883; 0312884; 0312885; 0312886**

**Laufzeit: 01.09.2002 bis 31.08.2004**

#### **Zusammenfassung**

Ziel des Vorhabens ist die Reduktion der Zahl von Tierversuchen zur kutanen Penetration und Permeation von Fremdstoffen durch eine standardisierte In-vitro-Methode. Eine validierte Alternativmethode, basierend auf biotechnologisch gewonnenen, kommerziell verfügbaren humanen Hautmodellen, soll als Ersatz- und Ergänzungsmethode die bei der Entwicklung und Prüfung von Industriechemikalien, Pflanzenschutzmitteln und Arzneimitteln hohe Zahl der Tierversuche erheblich reduzieren oder gar vollständig ersetzen. Es soll im Rahmen des beantragten Projekts eine OECD Richtlinie für die Prüfung auf Penetration von Fremdstoffen in sowie der Permeation durch die Haut erarbeitet werden, bei der sog. künstliche menschliche Haut verwendet wird.

Die Planung des Vorhabens berücksichtigt die einschlägigen Empfehlungen der OECD (Lodz, 1999; Online Veröffentlichungen im 12/2000). Dazu gehören insbesondere die Untersuchung von mehr als 10 Testsubstanzen, die sich deutlich in ihrer Lipophilie sowie in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Die Massenbilanz und die Intra- und Inter-Laborvariabilität der Daten werden bestimmt. In der beantragten ersten Förderphase soll die Methode entwickelt und prävalidiert werden, für eine zweite getrennte Phase sind die Validierung sowie ein In-vitro-/In-vivo-Vergleich vorgesehen.

#### **Sprecherin:**

Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

Institut für Pharmazie der

Freien Universität Berlin

Königin-Luise-Str. 2+4

D-14195 Berlin

msk@zedat.fu-berlin.de

#### **Summary**

Validation study for testing of skin penetration using biotechnologically deviced human skin

equivalents

The aim of this project is to reduce the number of animal experiments for the investigation of cutaneous penetration and permeation of xenobiotics by a standardised in vitro approach. The final goal is a validated alternative approach based on biotechnologically obtained and commercially available human skin models to be used for the development and testing of new or not yet finally characterised chemical entities, such as pesticides and pharmaceuticals. This approach should be capable of critically reducing or abolishing of the currently high numbers of so far indispensable animal experiments. It should become feasible to establish a new OECD guideline on the quantification of the skin penetration and permeation by xenobiotics using so-called artificial human skin. The study design is based on the general corresponding recommendations by OECD (Lodz, 1999; published online in 12/2000). It thus includes testing of at least 10 agents, which differ considerably in lipophilicity and molecular weight. Mass balance as well as intra- and interlaboratory variability of data will be determined. At first the test procedure will be developed and prevalidated. In a second separate step validation as well as an in vitro/in vivo comparison will be performed.

Corresponding author:

Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting Institut für  
Pharmazie der Freien Universität Berlin Königin-  
Luise-Str. 2+4 D-14195 Berlin msk(cD-zedat.fu-  
berlin.de

**Verbundprojekt: Photogenotoxizitätsprüfung: In-vitro-Tests zur Photogenotoxizitätsprüfung als Ersatz von Photokanzerogenitätsstudien an Nagern (Teilprojekte 1 bis 4)**

**Förderkennzeichen 0312916A; 0312916B; 0312916C; 0312916D Laufzeit:**

**01.08.2002 bis 31.07.2004**

**Zusammenfassung**

Chemische Verbindungen, die in der Lage sind, UV zu absorbieren und in Folge dessen reaktive Zwischenprodukte bilden, könnten das Risiko UV-bedingter Hauttumoren erhöhen, wenn sie als Arzneimittel oder in Kosmetika zur Anwendung kommen. Eine Bewertung des photokanzerogenen Potenzials als Teil der Produktsicherheitsüberprüfung ist daher unerlässlich. Gegenwärtig wird die experimentelle Prüfung auf Photokanzerogenität meist in einer 1-Jahres-Studie an haarlosen Mäusen durchgeführt, wobei nach wiederholter UVBestrahlung und Gabe der Testsubstanz die Ausbildung von Papillomen auf der Haut der Tiere untersucht wird. Bezüglich Interpretation der Befunde und Humanrelevanz des Testmodells bestehen jedoch erhebliche Unsicherheiten. Als mögliche Alternativen zur Voraussage des photokanzerogenen Potenzials werden In-vitro-Photogenotoxizitätstests an Säugerzellen vorgeschlagen. Der Zusammenhang zwischen Photogenotoxizität und Photokanzerogenität ist mechanistisch plausibel und experimentell durch gut untersuchte Beispiele, wie etwa die der Psoralene und Fluoroquinolone, überzeugend belegt. In einem vorangegangenen Projekt wurden mehrere Säugerzelltests hinsichtlich ihrer Eignung zur Erfassung photogenotoxischer/photokanzerogener Stoffe miteinander verglichen. Der Invitro-Mikrokerntest und der In-vitro-Cometassay, beide unter Verwendung von V79Zellen, stellten sich für die vorgesehenen Zwecke als am besten geeignet heraus. Für beide Tests wurden Entwürfe einer detaillierten Standardmethodenbeschreibungen erarbeitet. Das vorliegende Projekt hat zum Ziel, die Zuverlässigkeit dieser Testprotokolle unter den Bedingungen einer breiteren Anwendung zu überprüfen. Hierzu wird eine Ringstudie unter der Koordination des Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM, Bonn) durchgeführt, an der sich 7 Laboratorien aus dem Bereich der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie, Auftragsforschung, Universität und Behörde beteiligen werden. Insgesamt werden 13 sorgfältig ausgewählte Positiv-und Negativsubstanzen in beiden Testmodellen unter blinden Bedingungen geprüft werden. Jede Testsubstanz wird in mindestens vier verschiedenen Laboratorien parallel getestet. Hauptziele dieser Ringstudie sind einerseits die Bewertung der Reproduzierbarkeit und Interlabor-Variabilität, andererseits die Beurteilung der Sensitivität und Spezifität in der Voraussage des photogenotoxischen/photokanzerogenen Potenzials der Testsubstanzen. Darüberhinaus sollen mechanistische Aspekte der Photobiologie, die eine Rolle bei der Interpretation der Photogenotoxizitäts-Prüfergebnisse spielen können, gezielt untersucht werden (Untersuchungen zur Wechselwirkung von Phototoxizität und Photogenotoxizität; Untersuchungen zur Korrelation von molekularen DNA-Schadensspektren mit photogenotoxischen Effekten). Es wird erwartet, dass das Vorhaben einen erheblichen Beitrag leisten kann zur Weiterentwicklung und Optimierung der Photogenotoxizitäts-Testprotokolle, die dann den Erfordernissen regulatorischer Behörden genügen und entsprechend in der routinemäßigen Sicherheitsprüfung zum Einsatz kommen könnten. Die im Vorhaben gewonnenen Erkenntnisse sollen darüberhinaus gegenwärtige Pläne unterstützen, In-vitro-Photogenotoxizitätstests als Teil einer Testbatterie zur Beurteilung des photokanzerogenen Potenzials in eine zukünftige EURichtlinie für Photosicherheitsprüfung aufzunehmen.

**Kontaktadresse:**

Dr. Peter Kasper Leiter d. Fachgebietes „Genetische Toxikologie“ Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) Kurt-Georg-Kiesinger Allee 3 D-53175 Bonn Tel.: +49 228 207 3145 Fax: +49 228 207 3535

E-mail: p.kasper@bfarm.de

**Summary**

In vitro photogenotoxicity tests as an alternative to photocarcinogenicity studies with rodents

Chemical compounds that can be photoactivated to reactive intermediates following UV absorption may contribute to an increased risk of UV-associated skin cancer when used in pharmaceuticals or cosmetic preparations. Evaluation of the photocarcinogenic potential as part of product safety assessment is therefore essential. The current approach to test for photocarcinogenicity is a 1-year study in hairless mice in which the formation of skin papilloma is assessed after repeat exposures of the mice to UV irradiation and the test substance. However, there are significant uncertainties regarding data interpretation and relevance to humans of this test model. As a possible alternative for predicting the photocarcinogenic potential, the use of photogenotoxicity tests with mammalian cells has been suggested. The correlation between photogenotoxicity and photocarcinogenicity is mechanistically rational and also experimentally substantiated by the most thoroughly studied examples, i.e. psoralens and fluoroquinolones. In a preceding project, several mammalian cell tests were compared for their suitability in detecting photogenotoxic/photocarcinogenic compounds. The in vitro photo-micronucleus test and the in vitro photocomet assay, both with Chinese hamster V79 cells, were identified as most promising methods for this purpose. Detailed standard operations procedures have been drafted for both test models. In order to further investigate the reliability of the test protocols under conditions of a broader application the present project is designed as a collaborative study coordinated by the Federal Institute for Drugs and Medical Devices (Bonn, Germany) with participation of 7 laboratories from pharmaceutical and cosmetic industry, university, contract research, and regulatory agency. 13 carefully selected positive and negative test compounds will be studied in both assays under blind conditions. Each compound will be tested in parallel in at least four different laboratories. Main objectives of the ring trial are the evaluation of reproducibility and interlaboratory variability as well as an assessment of the sensitivity and specificity of both models in the prediction of photogenotoxic/photocarcinogenic compounds. In addition, some mechanistic aspects of photobiology which might have impact on the interpretation of the photogenotoxicity testing results will be investigated in more detail (relationship of phototoxicity with photogenotoxicity; correlation between the molecular spectrum of DNA photo damage and photogenotoxic effects).

The outcome of this project is expected to considerably contribute to the development of optimised in vitro photogenotoxicity test protocols that meet the needs of regulatory agencies

and can thus be used for routine safety testing. The findings of the project are also supposed to support the intended implementation of in vitro photogenotoxicity tests as part of a tiered approach for photocarcinogenicity assessment in a future EU-Note for Guidance on Photosafety Testing.

**Address for correspondence:** Dr. Peter Kasper Head of Genetic Toxicology Unit Federal Institute for Drugs and Medical Devices Kurt-Georg-Kiesinger Allee 3 D-53175 Bonn Germany Phone: +49 228 207 3145 Fax: +49 228 207 3535

E-mail: [p.kasper@bfarm.de](mailto:p.kasper@bfarm.de)

## **Verbundprojekt: Entwicklung eines Fischembryotests als Alternative für verlängerte und chronische Fischtests (Teilprojekte 1 bis 3)**

**Förderkennzeichen 0313015; 0313016; 0313017**

**Laufzeit: 01.10.2003 bis 30.09.2006**

### **Zusammenfassung**

Für die Prüfung der Ökotoxizität im Rahmen der Zulassung von Chemikalien, Bioziden, Pflanzenschutzmitteln und Veterinärpharmaka werden akute, verlängerte und chronische Fischtests eingesetzt. Für Humanpharmaka kann aufgrund zu erwartender Änderungen des Zulassungsverfahrens ebenfalls mit einer Durchführung dieser Tests gerechnet werden. Mit dem Zebraäbrblings-Fischembryotest (DarT – Danio rerio-Toxizitätstest) bzw. Fischei-Test steht im Rahmen der Chemikalien- und Abwasserprüfung eine Alternative für akute Fischtests zur Verfügung. Für verlängerte und chronische Fischtests gibt es jedoch noch keine Ersatzmethoden. Versuche mit Embryonen von Wirbeltieren (Embryokultur) zählen nach dem Tierschutzgesetz zu den schmerzfreien in vitro-Methoden (Organkultur) und sind als Ersatzmethoden anerkannt. Ziel des Forschungsprojektes ist die Entwicklung eines Verfahrens, das die Aussagefähigkeit ökotoxikologischer Untersuchungen mit Fischembryonen erweitert und dadurch den Ersatz von verlängerten bzw. chronischen Fischtests ermöglicht. Die Exposition mit Chemikalien kann unmittelbar oder mittelbar zu einer Veränderung von Genexpressionsmustern führen. Durch Analyse dieser Genexpressionsmuster im Zebraäbrblings-Embryo soll ein geeignetes Vorhersagemodell für verlängerte und chronische Fischtoxizität entwickelt werden. Hierzu werden mit Hilfe von zwei Modellsubstanzen (3,4-Dichloranilin und Cadmiumchlorid) unter Verwendung eines Zebraäbrblings-Oligo-Arrays mit 14.000 unabhängigen Gensequenzen zunächst geeignete sensitive Marker-Gene identifiziert (d.h. Gene, die bei Exposition mit Chemikalien induziert oder reprimiert sind). Mit Hilfe ausgewählter Marker-Gene wird dann ein Testsystem auf Basis der RT-PCR entwickelt und für die Analyse weiterer Testsubstanzen eingesetzt. Hierzu werden 15-20 Testsubstanzen ausgewählt, für die bereits Daten aus verlängerten und chronischen Fischtests vorliegen. Außerdem werden Genexpressionsmuster von exponierten Embryonal-, Larval- und Juvenilstadien verglichen. Anschließend wird überprüft, ob die Veränderungen der Genexpressionsmuster im Embryo mit toxischen Effekten in verlängerten und chronischen Fischtests korrelieren. Auf Basis der Projektergebnisse soll ein Vorschlag für eine Prüfrichtlinie erarbeitet werden, die den Ersatz von verlängerten und chronischen Fischtest durch den Genexpressions-Danio rerio-Toxizitätstest (Gen-DarT) ermöglichen soll. Das Forschungsprojekt wird in Zusammenarbeit des UFZ (Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Department Zelltoxikologie), der Technischen Universität Dresden (Institut für Hydrobiologie) und der ECT Oekotoxikologie GmbH (Flörsheim/Main) durchgeführt.

### **Projektkoordinator und Ansprechpartner**

Dr. Stefan Scholz Department Zelltoxikologie UFZ  
Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH  
Permoserstr. 15 D-04381 Leipzig Tel. +49 341 235 2334  
Fax +49 341 235 2401 Email: stefan.scholz@ufz.de

Development of a fish embryo test as alternative to prolonged and chronic fish tests: Analysis of toxic effects based on modified gene expression patterns in the *Danio rerio* embryo test

**Summary** Acute, prolonged and chronic fish tests are used for ecotoxicity testing in the process of the registration of chemicals, biocides, pesticides and veterinary pharmaceuticals. For human pharmaceuticals, the performance of these tests can also be anticipated in future registration processes. An alternative test system for the acute fish test, the zebrafish embryo test (DarT – *Danio rerio* toxicity test) or fish-egg test, respectively, is available for the testing of chemicals and whole effluents. Until now, no alternative test methods have been developed for prolonged and chronic fish tests. According to the animal protection act, investigations with vertebrate embryos belong to the pain-free in vitro methods (organ cultures) and are admitted as alternative test systems. Thus, the aim of the study is to develop the fish embryo test towards a test system, which can replace prolonged and chronic fish tests. Exposure to chemicals can directly influence the expression of target genes. It may also lead to the modification of gene expression patterns via interference with signal transduction pathways and/or by induction of stress/protective responses of the cell. The objective of this research project is to develop a test system based on gene expression for zebrafish embryos to predict toxic effects in chronic and prolonged fish tests. In order to identify appropriate sensitive marker genes, zebrafish embryos will be exposed to two model test substances, 3,4-dichloroaniline and cadmium chloride. The gene expression patterns will be analysed using an oligo DNA array containing 14,000 independent gene sequences of the zebrafish. Differentially expressed genes will be identified and suitable genes will be selected as markers to establish an RT-PCR based test system. Using this test system 15-20 test substances and their effects on the expression of the selected marker genes will be analysed. For this purpose, test substances for which results of prolonged and chronic fish tests are available, will be selected. Furthermore gene expression patterns of exposed embryos, larvae and juvenile fish will be compared. It will be verified, whether there is a correlation between gene expression patterns in fish embryos and toxic effects in prolonged and chronic fish tests. Based on the results of the project, a proposal for a test guideline that allows the replacement of chronic fish tests by a gene expression *Danio rerio* toxicity test (Gen-DarT) will be developed. The research project is a co-operation of the UFZ Centre for Environmental Research Leipzig-Halle (Department Cell Toxicology), the University of Dresden (Institute of Hydrobiology) and ECT Oekotoxikologie GmbH (Flörsheim/Main).

**Project co-ordinator and correspondence address**

Dr. Stefan Scholz Department Cell  
Toxicology UFZ Centre for  
Environmental Research Leipzig-Halle  
Permoserstr. 15 D-04381 Leipzig  
Germany Tel. +49 341 235 2334 Fax  
+49 341 235 2401 Email:  
stefan.scholz@ufz.de

**Verbundprojekt: In vitro Testsysteme zur Früherkennung Nieren-karzinogener Substanzen (0313024A) (Teilprojekte 1 bis 3)**

**Förderkennzeichen 0313024A; 0313024B; 033024C**

**Laufzeit: 01.10.2003 bis 30.09.2006**

**Zusammenfassung**

Aus der Häufigkeit des Auftretens nicht hereditärer Nierentumore beim Menschen, sowie aus der neuen EU Chemikalien Politik, die den Einsatz von in vitro Technologien vorschreibt, ergibt sich die Notwendigkeit ein in vitro Testsystem zu etablieren, welches das kanzerogene Risiko von Fremd-oder Naturstoffen erfasst und die Anzahl der bis dato dazu notwendigen Tierversuche im Sinne der 3R-Regel reduziert.

Ziel dieses Projektes ist es, ein schnelles, effizientes und robustes in vitro Testsystem zur Früherkennung nierenkarzinogener Substanzen aufzubauen. Dazu sollen in Nierenzelllinien, primären Zellkulturen (jeweils von Ratte, Mensch und Schwein) und in ex vivo Material (Ratte) frühe molekular-toxikologische Veränderungen in Abhängigkeit vom Typ (Mechanismus) und der kanzerogenen Substanz (epigenetisch oder genotoxisch) sowohl auf RNA- wie auch auf Proteinebene untersucht und charakterisiert werden. Molekulare Biomarker sollen im angestrebten Testsystem, das auf primären Zellen basieren wird, als Grundlage für die kanzerogene Risikoabschätzung von Fremd- und Naturstoffen dienen. Der Einsatz und Vergleich von primären Zellen, Zelllinien und ex vivo Material bei der Entwicklung des Testsystems soll eine möglichst hohe Übertragungs- und Verwertungssicherheit des neuen in vitro Modells gewährleisten. Langfristiges gesehen soll das in vitro Modell die Anzahl der bei der Entwicklung neuer Pharmaka oder bei der Überprüfung von Fremd-und Naturstoffen notwendigen Tierversuche reduzieren, indem die im Prä-screening positiv identifizierten Substanzen nicht mehr weiter untersucht werden. Das in vitro Modell soll durch den Einsatz primärer humaner Zellen des weiteren eine verlässlichere Risikoextrapolation der Daten auf den Menschen sowie eine verbesserte Interpretation bereits bestehender in vivo Studien erlauben.

Dieses Projekt, das im Rahmen des Programms "Biotechnologie -Chancen nutzen und gestalten" vom Bundesministerium für Bildung und Forschung mit dem Ziel gefördert wird, Tierversuche durch Alternativmethoden zu ersetzen, bzw. zu ergänzen, wird von der Universität Konstanz (AG Umwelttoxikologie) in Zusammenarbeit mit der Universität Kaiserslautern (AG Zellbiologie) und der Bayer AG (Molekulare und Genetische Toxikologie) durchgeführt.

**Projektkoordinator**

• Prof. Dr. Daniel Dietrich AG Umwelttoxikologie/ FB  
Biologie Universität Konstanz Postfach 918 78457 Konstanz  
Germany Tel: ++49 -(0)7531 - 88 - 3518 Tel: ++49 -(0)7531  
- 88 - 3171 (Sekretariat) FAX: +49 - (0)7531 / 88 - 3170  
Email: daniel.dietrich@uni-konstanz.de

## **Projektpartner**

- Prof. Dr. Bernhard Brüne

AG Zellbiologie/ FB Biologie  
Universität Kaiserslautern Erwin-  
Schrödinger-Strasse / Geb. 13 67663  
Kaiserslautern Germany Tel: ++49 -  
(0)631 -205 - 2490 FAX: +49 (0)631  
-205 - 2492 Email: bruene  
(@,rhrk.unikl.de

- Dr. Dr. Hans J. Ahr Bayer HealthCare  
AG PH-PDP-T Toxikologie 42096  
Wuppertal Germany Tel: +49 -(0)202  
- 364256 FAX: +49 - (0)202 -364137  
Email: Hans-

Juergen.Ahr@ffibayerhealthcare.com

- Dr. Heinrich Hildebrand  
BayerHealthCare AGPH-PDP-T  
Toxikologie 42096Wuppertal  
Germany Tel. +49 - (0)202 – 368141  
Fax: +49 - (0)202 - 364137

On a long term basis, this in vitro test system shall reduce the amount of animal experimentation necessary for testing substances for carcinogenic potential, as substances, which test positive, must not be further investigated using in vivo experiments. Furthermore, the use of primary human cells, confers additional advantages an this test system, namely improved human risk assessment as weil better interpretation of previously conducted in vivo studies.

This project, which is funded by the federal ministry for education and research within the framework of the program "Biotechnologie -Chancen nutzen und gestalten" with the aim to replace or reduce animal experimentation, is being carried out by the University of Konstanz (research group environmental toxicology), in cooperation with the University of Kaiserslautern (research group cell biology) and Bayer AG (Department of Molecular and Genetic Toxicology).

### **Project Coordinator**

- Prof. Dr. Daniel Dietrich

Environmental Toxicology / Department of Biology  
University of Konstanz Postfach 918 78457 Konstanz  
Germany Phone: +49 -(0)7531 - 88 -3518 Phone: +49  
- (0)7531 - 88 - 3171 (Sectretary) FAX: +49 - 7531 -  
88 - 3170 Email: daniel.dietrich(a-uni-konstanz.de

### **Project Partner**

Email: heinrich.hildebrand( baverhealthcare.com

- Prof. Dr. Bernhard Brüne Cell Biology / Department of

**Biology** University of Kaiserslautern Erwin-

Schrödinger-Strasse / Geb. 13 67663 Kaiserslautern

Germany Phone: +49 - (0)631 - 205 - 2490 FAX: +49

(0)631 - 205 - 2492 Email: bruene@arhrk.uni-kl.de

- Dr. Dr. Hans J. Ahr Bayer HealthCare AG PH-PDP-T

The frequency of non-hereditary kidney cancer, together with the new politics of the EU, which

support the use of in vitro technology, warrant the establishment of an in vitro test system,

(0)202 - 364256 FAX: +49 - (0)202 - 364137 Email:

Hans-Juergen.Ahr(&baverhealthcare.com

- Dr. Heinrich Hildebrand Bayer HealthCare AG PH-

PDP-T Toxikologie 42096 Wuppertal

The aim of this project is to establish a quick, efficient and robust in vitro test system for the early detection of substances with renal carcinogenic effects. Therefore, kidney cell lines, primary renal cell cultures (from human, rat and pig) as weil as ex vivo material (rat) will be employed for the identification of the early molecular toxicological changes caused by chemicals with known carcinogenic mechanisms (epigenetic or genotoxic). These changes will be analyzed at both the RNA and Protein expression level. The use and comparison of primary cells, cell lines (human, rat and pig) and ex vivo material (rat), should ensure a high degree of reliability for the test system and moreover, allow extrapolation between the in vitro and in vivo situations, as weil as an interspecies comparisons. The final test system will be based an the detection of molecular biomarkers in primary cells.

Germany Phone: +49 - (0)202 - 368141 Fax: +49 -  
(0)202 - 364137 Email:  
heinrich.hildebrand@Cbaverhealthcare.com

# **Projekt Entwicklung einer in vitro-Methode zur Bestimmung von Tetanus-Toxizität**

**Förderkennzeichen 0313032**

**Laufzeit: 01.07.2003 bis 30.06.2006**

## **Zusammenfassung**

Projektleitung: Dr. Beate Krämer und Dr. Karin Weißer

Durchführung: Dr. Birgit Kegel, Ursula Bonifas, Katja Silberbach

Tetanusimpfstoffe sind Toxoidimpfstoffe, d.h. sie werden aus dem Toxin des Bakteriums *Clostridium tetani* durch Detoxifizierung hergestellt. Zum Ausschluss einer eventuell verbleibenden Resttoxizität müssen, nach Vorgaben des Europäischen Arzneibuches, sowohl Human- als auch Veterinärimpfstoffe im Tierversuch getestet werden. Im Rahmen dieser gesetzlich vorgeschriebenen Unbedenklichkeitsprüfungen wird jede Impfstoffcharge auf „Abwesenheit von Tetanustoxin und Irreversibilität des Toxoids“ an 10 Meerschweinchen getestet. Im Veterinärbereich wird zusätzlich die „Unschädlichkeit“ des Endprodukts an 5 Meerschweinchen überprüft. Keines der Tiere darf nach Injektion des Impfstoffs im Beobachtungszeitraum von 3 Wochen Krankheitszeichen zeigen oder sterben. Im Rahmen des seit 1.7.2003 laufenden BMBF-Projektes „Entwicklung einer in vitro-Methode zur Bestimmung von Tetanus-Toxizität“ soll ein in vitro-Testsystem zum funktionellen Nachweis von Tetanustoxin entwickelt werden, um den vorgeschriebenen Tierversuch zu ersetzen. Das zu etablierende in vitro-Verfahren soll mit Standardlabormethoden routinemäßig durchführbar sein und eine dem Tierversuch vergleichbare Sensitivität besitzen. In einem Vorläuferprojekt wurden bereits grundlegende Fragestellungen geklärt und die Basis für einen Endopeptidase-Assay entwickelt. Das Tetanustoxinmolekül besitzt, wie andere Bakterientoxine auch, eine enzymatische Komponente. Tetanustoxin spaltet, nach neuronaler Aufnahme und axonalem Transport, intrazellulär hochspezifisch das vesikuläre Membranprotein Synaptobrevin 2 (auch VAMP2). Dieser Eigenschaft kommt vermutlich die entscheidende Rolle in der Pathogenese einer Tetanusvergiftung zu.

Diese spezifische Proteaseaktivität soll für einen Endopeptidase-Assay genutzt werden. Endopeptidase-Assays mit ELISA-ähnlichem Aufbau sind für andere Clostridientoxine bereits beschrieben (z. B. Botulinumtoxine).

Die Peptidbindung, innerhalb der Tetanustoxin Synaptobrevin 2 hochspezifisch spaltet, liegt zwischen den Aminosäuren Gln 76 und Phe 77. Im Gegensatz zu anderen Metalloproteasen reicht ein kurzes Peptid als vollwertiges Substrat nicht aus. Für die Entwicklung des Assays steht uns rekombinantes Synaptobrevin 2 zur Verfügung. Das Protein ist dahingehend modifiziert, dass es am N-Terminus einen Polyhistidin-Tag besitzt und dass der für die Transmembranregion codierende Bereich deletiert wurde. In Spaltversuchen zeigte sich, dass diese Modifikationen für die Funktion des Synaptobrevins als Substrat für Tetanustoxin keine Rolle spielen.

Das Funktionsprinzip des Assays besteht darin, dass rekombinantes Synaptobrevin an eine Mikrotiterplatte gebunden wird und nach Zugabe von Tetanustoxin die spezifische Spaltung nachgewiesen werden kann. Die Detektion der Spaltung erfolgt durch einen Peptidantikörper, der gegen die N-terminale Peptidsequenz unmittelbar an der Spaltstelle gerichtet ist. Als Prüfmuster wurden bisher Toxoide und artifiziell mit Tetanustoxin kontaminierte Toxoide eingesetzt. Untersuchungen mit den Toxoidimpfstoffen von verschiedenen Herstellern haben

gezeigt, dass die Produkte selbst eine unspezifische Proteaseaktivität besitzen und das Substrat Synaptobrevin 2 fragmentieren. Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei einer der Proteasekomponenten um eine Serinproteasen handelt.

Ziele und aktueller Stand der Assayentwicklung:

Die spezifische Spaltung von Synaptobrevin durch Tetanustoxin lässt sich nachweisen.

Der Endopeptidase-Assay muss weiter optimiert werden, um eine dem Tierversuch vergleichbare Sensitivität zu erreichen.

Die in verschiedenen Toxoidpräparaten beobachtete unspezifische Proteaseaktivität muss dezimiert werden

Die Herstellung von Antikörpern zur spezifischen Detektion der Spaltprodukte wird fortgeführt

### **Kontaktadresse:**

Dr. Karin Weißer Paul-  
Ehrlich-Institut D-63225  
Langen Tel. 0049  
(0)6103/77-3602 e-mail:  
weika@pei.de

### **Summary**

Development of an in vitro method for the determination of tetanus toxicity

Project management: Dr. Beate Krämer and Dr. Karin Weißer Implementation:  
Dr. Birgit Kegel, Ursula Bonifas, Katja Silberbach

Tetanus vaccines are toxoid vaccines, i.e. they are prepared from the toxin of the bacterium *Clostridium tetani* by detoxification. To rule out possible residual toxicity, the European Pharmacopeia stipulates that both human and veterinary vaccines must be tested in an animal test. Within this safety testing which is compulsory by law, each vaccine batch is tested for the "absence of toxin and irreversibility of toxoid" in 10 guinea pigs. In the fields of veterinary medicine, the "safety" of the final product is tested in five guinea-pigs. After receiving an injection of the vaccine, none of the animals may die nor show any signs of disease during an observation period of 3 weeks.

Within the BMBF project entitled "Development of an in vitro method for the determination of tetanus toxicity", which started on 1 st July 2003, an in vitro test system shall be developed to replace the compulsory animal experiment. The in vitro procedure to be established shall be applicable routinely using standard laboratory methods and display a degree of sensitivity comparable with that of the animal test. A precursor project clarified the basic questions and developed the basis for an endopeptidase assay.

Like other bacterial toxins, the tetanus molecule has an enzymatic component. After neuronal uptake and axonal transport, tetanus toxin highly specifically cleaves the vesicular membrane protein Synaptobrevin 2 (also called VAMP2) within the cell. This characteristic probably appears to play a crucial part in the pathogenesis of tetanus poisoning. This specific

protease activity shall be used for an endopeptidase assay. Endopeptidase assays with an ELISA-like design have already been described for other clostridial toxins (e.g. botulinum toxins).

The peptide bond where Synaptobrevin 2 is cleaved specifically by tetanus toxin is situated between the amino acids Gln 76 and Phe 77. In contrast to other metalloproteases, a short peptide is not sufficient to act as full substrate. For the development of the assay, recombinant Synaptobrevin 2 is available to us. The protein has been modified in such a way that it has a polyhistidin tag at the N terminus, and the area coding for the transmembrane region has been deleted. Cleavage assays showed that these modifications do not play a role for the function of synaptobrevin as substrate for tetanus toxin.

The assay is based on the principle that recombinant synaptobrevin is bound to a microtitre plate, and that the specific cleavage can be determined after addition of tetanus toxin. The detection of the cleavage is performed by means of a peptide antibody directed against the N terminal peptide sequence which is located directly at the cleavage site.

Up to now, toxoids and toxoids artificially contaminated with tetanus toxin have been used as test samples. Studies with the toxoid vaccines from various manufacturers have shown that the products themselves display unspecific protease activity and fragment the substrate "Synaptobrevin 2". Results indicate that one of the protease components is serin protease.

Objectives and current state of the assay development:

The specific cleavage of synaptobrevin by tetanus toxin can be detected.

The endopeptidase assay must be further optimised, in order to reach a sensitivity comparable with the animal test.

The preparation of antibodies for the specific detection of the splitting products shall be continued.

**Verbundprojekt: Weiterentwicklung eines in vitro-Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen der Maus (Phase II): Analyse embryotoxischer Wirkungen unter Berücksichtigung neuer Endpunkte und der Metabolisierung bei Verwendung einer erweiterten Stoffauswahl, Teilprojekte 1 – 5**

**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0313070A, 0313070B, 0313070C, 0313070D, 0313070E**

**Laufzeit: 01.04.2004 bis 31.03.2007**

**Zusammenfassung**

Zur Prüfung der embryotoxischen Eigenschaften von Industriechemikalien, Pflanzenschutzmitteln, kosmetischen Inhaltsstoffen und Arzneimitteln kommen bis heute vorwiegend Tierversuche zum Einsatz, die zum einen sehr zeitaufwendig und kostenintensiv sind und zum anderen mit einer starken Belastung für die schwangeren Versuchstiere einhergehen. Aus diesem Grund wird der Entwicklung von aussagekräftigen und zeitsparenden in vitro-Methoden, die auf Zellkulturverfahren basieren und als Alternativverfahren zum Tierversuch dienen können, eine zunehmende Bedeutung beigemessen. Als eine vielversprechende Ersatz- und Ergänzungsmethode zum konventionellen Tierversuch mit Ratten und Mäusen erwies sich der Embryonale Stammzell-Test (EST) Dieses Testmodell nutzt das Potential pluripotenter embryonaler Stammzellen der Maus, in vitro spontan in terminal differenzierte somatische Zellen aller drei Keimblätter, unter anderem auch in kontrahierende Herzmuskelzellen, zu differenzieren. Zur Vorhersage des embryotoxischen Potentials von Prüfsubstanzen wird die Hemmung der Differenzierung pluripotenter embryonaler Stammzellen der Maus in kontrahierende Herzmuskelzellen gemessen. Im Rahmen einer internationalen Ringstudie des Europäischen Zentrums für Alternativmethoden (ECVAM), bei der insgesamt 20 Chemikalien mit unterschiedlichen embryotoxischen Eigenschaften untersucht wurden, hat der EST sehr erfolgreich abgeschnitten. Darauf aufbauend wurde im Jahr 2000 im Rahmen eines vom BMBF geförderten Forschungsprojektes mit der Weiterentwicklung des Tests unter Einbeziehung molekularer Marker begonnen. Da diese Arbeiten sehr erfolgreich verliefen, kann die Differenzierung nun qualitativ und quantitativ durch FACS-Analysen und quantitative PCR erfasst werden. Außerdem konnte die Dauer des EST erheblich verkürzt werden. Durch diese Verbesserungen ist der EST nun beim teil-automatischen Screening neuer Stoffe als in vitro-Embryotoxizitätstest einsetzbar und er wird dazu bereits erfolgreich in der Arzneimittelindustrie zu diesem Zweck angewendet. Für die behördliche Akzeptanz des EST halten Experten aus internationalen Zulassungsbehörden und der Arzneimittelindustrie die Testung weiterer Stoffe bzw. Stoffgruppen, die Einbeziehung von metabolisierenden Systemen zur Erkennung pro-teratogener Substanzen und die Detektion weiterer gewebespezifischer Endpunkte für absolut erforderlich. Aus den genannten Gründen soll der EST im Fortsetzungsprojekt anwendungsorientiert in folgenden Punkten erweitert und optimiert werden: Verbreiterung der Datenbasis – Auswahl von Stoffen und Substanzklassen unterschiedlicher Teratogenität und deren Untersuchung im EST mit biometrischer Auswertung und Erstellung eines verbesserten Prädiktionsmodells (PM). Metabolismus – Etablierung und Vergleich metabolisierender primärer und permanenter Zelllinien (einschl. verschiedener Spezies) und Entwicklung verschiedener Testsysteme (z.B. Co-Kultur).

. Neue neuronale Endpunkte - Einbeziehung eines neuroektodermalen Differenzierungsendpunktes (Neuronen) zusätzlich zum mesodermalen Endpunkt Herz.

Die wissenschaftliche Weiterentwicklung des EST als in vitro-Embryotoxizitätstest wird seinen Stellenwert als Ersatzmethode zu den etablierten in vivo-Verfahren nachdrücklich verbessern und somit auch seine Akzeptanz für die Aufnahme in behördliche Richtlinien.

### **Summary**

Improving a murine embryonic stem cell-based in vitro embryotoxicity test (phase II): Incorporation of cellular metabolism, establishment of new developmental endpoints and extension to new substance classes Assessing toxicity of chemicals for development and the reproductive cycle requires extensive screening and multi-generation studies. For chemicals used as drugs, segment studies have to be conducted covering preconceptional exposure as well as pre- and postnatal development including the lactation period (guidelines of the International Conference on Harmonization, ICH, 1993). These in vivo test methods are time-consuming, expensive and have to be carried out on high numbers of laboratory animals. Therefore, new predictive screens for risk assessment with respect to developmental toxicity need to be developed with the ultimate goal of reducing animal use and testing more chemicals than can be accommodated by conventional whole-animal testing. In vitro alternatives such as whole embryo cultures and cellular models using primary cultures and permanent cell lines have been developed. In the most recently developed test, the embryonic stem cell test (EST), blastocyst-derived pluripotent embryonic stem (ES) cells of the mouse are used to assess the embryotoxic potential of test chemicals. In an international ECVAM validation study the EST has been demonstrated to be a reliable nonanimal test system for embryotoxicity using a set of 20 reference compounds characterized by high quality in vivo embryotoxicity data assessed in laboratory animals and humans. In a joint research project funded by the BMBF the EST protocol has been successfully improved by establishing molecular endpoints of differentiation in cultured ES cells. In this novel approach the expression level of tissuespecific marker proteins under influence of the test chemical are quantified by intracellular flow cytometry and Real-Time TaqMan-PCR. Compared to the morphological analysis of beating cardiomyocytes, expression profiles of selected tissue-specific marker genes may facilitate the adaptation of the EST to applications in highthroughput screening systems. The EST can be usefully employed as a component of the risk/hazard assessment process. However, experts from regulatory authorities as well the pharmaceutical industry recommended further improvements of the assay system. Limitations identified focused primarily on the limited number of test compounds tested in the ECVAM validation trial, the absence of a metabolic system in the EST and the selection of a toxicological endpoint based on cardiac differentiation of ES cells which may lead to false negative results if specific cell types other than the myocardium are affected by the test chemical. For these reasons major goals of the BMBF grant renewal are: Enlargement of the database – testing of different chemical classes representing the various mechanisms underlying developmental toxicity, development of improved prediction models (PM). Establishment of additional cell-type specific endpoints - differentiation of neural cells from embryonic stem cells Establishment of a metabolizing system as an adjunct to the validated EST protocol based on various primary cultures and permanent cell lines from different species. These improvements will considerably facilitate regulatory acceptance of the EST as a non-animal system for developmental toxicity.

### **Kontaktinformation der Projektkoordinatoren:**

Dr. Horst Spielmann phone: +49 (0)30 8412-2270

Dr. Andrea Seiler -2278 fax: +49 (0)30 8412-2958

Zebet Center for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments Federal Institute for Risk Assessment Diedersdorfer Weg 1 D-12161 Berlin, Germany

e-mail: [zebet@bfr.bund.de](mailto:zebet@bfr.bund.de)

homepage: <http://www.bfr.bund.de>

**Verbundprojekt: Zelltransfektionsarray – eine Hochdurchsatzmethode für Genfunktionsstudien in Säugetierzellen als Alternative zu knockout und transgenen Mausstudien (Teilprojekte 1 bis 3)**

**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0313068A, 0313068B, 0313068C**

**Laufzeit: 01.05.2004 bis 30.04.2007**

**Zusammenfassung**

Das Studium von "loss-of-function"-Mutationen anhand von knockout Tieren und "gain-of-function"-Mechanismen mit konsekutiver Überexpression der interessierenden Gene im Mausmodell sind allgemein etablierte in vivo Methoden zur Analyse von spezifischen Genfunktionen. Der unbestrittenen Bedeutung dieser Methoden im Bereich der funktionellen Genomik steht die Tatsache gegenüber, dass diese Techniken an sich eine große Anzahl an Versuchstieren benötigen und zwar sowohl für die Generierung der gewünschten, genmanipulierten Organismen als auch für die weiterführenden Analysen der Genfunktionen in den verschiedensten physiologischen Zellpopulationen. Dies wirft ethische Grundsatzfragen bezüglich der Anzahl der durchgeführten Tierversuche auf, und ist darüber hinaus, aufgrund der Kostenintensität einer Tierzucht, zusätzlich teuer. Außerdem entsteht ein hoher Aufwand bei Erwerb und Haltung von Versuchstieren sowie bei der Projektdurchführung selbst. Es gibt daher einen eindeutigen Bedarf für die Entwicklung und Optimierung von in vitro Technologien, die auf Ersatz- und Ergänzungssysteme zum Tierversuch und zu den etablierten knockout und transgenen Mausmodellen abzielen. In dem vorliegenden Projekt beabsichtigen wir die Entwicklung einer effizienten in vitro Methodik, das Zelltransfektionsarray (Transfected-Cell Array, TCA), welches wir als Alternative zur Generierung genmanipulierter Tiere sowohl für "loss-of-function"- als auch für "gain-of-function"-Analysen in primären Säugetierzellen etablieren wollen. Wir werden dazu zum einen die RNA Interferenz (RNAi)-Technologie nutzen, die es erlaubt, direkt in primären Zellsystemen bestimmte Zielgene zu inaktivieren und damit ihre Funktion gleichzeitig in unterschiedlichsten Zelltypen zu analysieren. Zum anderen werden wir die vorgestellte Technologie für Genüberexpressionsstudien nutzen, indem wir parallel viele verschiedene Gene transfizieren, um ihre Effekte auf die zelluläre Physiologie bei einer Überexpression gleichzeitig zu untersuchen. Der Array-basierte Ansatz soll in beiden Fällen ermöglichen, eine große Anzahl, für eine bestimmte Zellfunktion möglicherweise relevante Kandidatengene parallel auszuschalten bzw. zu überexprimieren und so ihre Bedeutung im physiologischen Kontext zu prüfen. Durch die Verwendung hochaufgereinigter primärer Zellen kann dabei die Genfunktion direkt in den physiologischen Zielzellen untersucht werden. Gleichzeitig werden für diesen Ansatz nur minimale Zellmengen benötigt. Beides würde zu einer erheblichen Reduzierung von Tierexperimenten auf dem Gebiet der in vivo Genmanipulation führen.

**Projektkoordinator:**

Dr. Michal Janitz Max-Planck-Institut für molekulare Genetik Abteilung Wirbeltiergenomik  
Fabeckstrasse 60-62 D-14195 Berlin Tel. +4930 8413 1463 Fax +4930 8413 1462 Email:  
janitz@molgen.mpg.de

**Summary**

Transfected-cell array - a high throughput tool for gene functional studies in mammalian cells as alternative to knockout and transgenic mouse studies

Loss-of-function studies using knock-out mice and gain-of-function studies using transgenic mice are a well-established approach to study gene function in in vivo situation. Besides undisputed contribution in the field of functional genomics these techniques intrinsically require a large number of animals for the production of the gene-manipulated animals as well as for the testing of gene function in the various physiologic cell populations. This requirement raises ethical issues concerning experimentation on animals, but it is also expensive due to the high cost of animal maintenance. Therefore, there is a clear need for development and optimization of in vitro technologies, which could contribute to reduction, if not replacement, of animals in the existing knockout and transgenic mice technology. In this proposal we aim to develop a high-throughput in vitro experimental approach, the transfected cell array (TCA), in primary mammalian cells as an alternative to generation of genetically manipulated animals for loss-of-function as well as for gain-of-function studies. For that purpose we will use the RNA interference (RNAi) technology, which allows a specific inactivation of target genes. Thus, genes functions in various cell types can be investigated. Throughout this project the transfected cell array technique will be also used for gene overexpression studies, whereby many different genes will be transfected in parallel into the cells. Hence, gain-of-function effects of gene overexpression on cellular physiology will be observed. The array-based method allows for high throughput functional analysis of hundreds of genes with the minimal cell number requirements. Moreover, usage of primary cells implies that experimental results can be directly transferred into in vivo situation in animal models and man. Taking together the ultimate goal of this project is to establish a robust and efficient functional genomics technology platform which can lead to substantial reduction of animal experimentation in the field of molecular genetics.

### **Project Coordinator**

Dr. Michal Janitz Max Planck Institut for Molecular Genetics Department  
Vertebrate Genomics Fabeckstrasse 60-62 D-14195 Berlin Tel. +4930 8413 1463  
Fax +4930 8413 1462 Email: [janitz@molgen.mpg.de](mailto:janitz@molgen.mpg.de)

**Verbundprojekt: Erfassung und Analyse hepatotoxischer Wirkungsmechanismen zur Prädiktion kanzerogener Wirkungen von chemischen Stoffen im subakuten Toxizitätstest (28-Tage Test OECD TG 407), Teilprojekte 1 – 3**

**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0313137; 0313138; 0313139**

**Laufzeit: 01.07.2004 bis 30.09.2007**

**Zusammenfassung**

Die Ermittlung des Gesundheitsrisikos von chemischen Stoffen für den Menschen beruht auf der Durchführung und Bewertung von Tierversuchen. Mit diesem traditionellen Vorgehen der Toxizitätstestung ist jedoch eine Reihe von Problemen verbunden, u. a. die ethische Frage der Durchführung von belastenden Tierversuchen. Durch den Einsatz von neuen Methoden der Molekularbiologie ('Toxiko-Genomik, -Proteomik') lässt sich ein toxikologischer ‚Fingerprint‘ ermitteln, mit dem sich Wirkungen chemischer Stoffe auf einer neuen Basis klassifizieren lassen. Das Projekt basiert auf dem Einsatz von Gen- und Proteinexpressionsanalysen in Verbindung mit einem in der regulatorischen Toxikologie häufig durchzuführenden Kurzzeit-Tierversuch (OECD TG 407). Die gemeinsame Anwendung von etablierten und innovativen Methoden in einem tierexperimentellen Ansatz liefert wesentlich mehr Informationen. Um nachzuweisen, dass sich toxische Mechanismen auf molekularbiologischem Niveau abbilden lassen, werden beispielhaft Vertreter verschiedener Klassen von Leberkrebs-erzeugenden Chemikalien getestet. Durch die zusätzlich gewonnenen Daten erhofft man sich viel früher als bisher mit konventionellen Techniken der Pathologie möglich, Voraussagen zur krebserzeugenden Wirkung von Stoffen machen zu können. Falls dies gelingt, wird diese Strategie wirksam zu einer Reduktion von Langzeit-Tierversuchen beitragen.

**Kontaktinformation**

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR),  
Thielallee 88-92, 14195 Berlin

PD Dr. Hans-Bernhard Richter Reichhelm Tel. 03018412-3832

Dr. Axel Oberemm Tel. 03018412-3238

E-Mail: h.richter-reichhelm@bfr.bund.de

E-Mail: a.oberemm@bfr.bund.de

**Summary**

Detection and analysis of hepatotoxic modes of action for prediction of carcinogenic effects of chemicals using the subacute toxicity test (28 days/ OECD TG 407)

Assessment of the health risk posed by chemicals is based on exposure analysis and on the performance and evaluation of toxicity testing in animals. This traditional approach of toxicity testing involves a number of problems. In particular, long-term testing to detect carcinogenic effects is rather time-consuming and raises ethical concern. Due to species-specific differences, there remain problems in the evaluation of results from animal studies and their

extrapolation to man, unless mechanistic data are provided. Toxicogenomic and -proteomic approaches are widely explored to evaluate their usefulness for detecting early toxicological endpoints and for gaining insight into the mechanisms behind the toxic response. In this study, effects of different types of hepatocarcinogens and non-carcinogens are analyzed using a common short-term animal bioassay (OECD TG 407). If this strategy proves to be successful by providing specific patterns of toxic mechanisms, this approach may be used to significantly reduce long-term animal studies in the near future.

**contact address**

Federal Institute for Risk Assessment (BfR),  
Thielallee 88-92, 14195 Berlin

PD Dr. Hans-Bernhard Richter  
Reichhelm Tel. +49(0)30/8412-3832 E-  
Mail: [h.richter-reichhelm@bfr.bund.de](mailto:h.richter-reichhelm@bfr.bund.de)

Dr. Axel Oberemm Tel.  
+49(0)30/8412-3238 E-Mail:  
[a.oberemm-@bfr.bund.de](mailto:a.oberemm-@bfr.bund.de)

## **Verbundprojekt: Vermeidung von In-vivo-Lungenfunktionsmessungen in pharmakologischen und toxikologischen Untersuchungen**

**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0313292A, 0313292B**

**Laufzeit: 01.08.2004-31.07.2007**

### **Zusammenfassung**

Es entsteht zunehmend Bedarf, Industriechemikalien und Umweltschadstoffe auf ihr irritatives und allergenes Potential und die damit verbundene Verschlechterung der Lungenfunktion zu testen. Diese Messungen werden in vivo durchgeführt und sind mit erheblichem Belastung für die Tiere verbunden. Ziel des Vorhabens ist die Entwicklung und Validierung von Ersatzmethoden zu den bisher gebräuchlichen Tierversuchen. Ersatz von in vivo- durch in vitro-Testverfahren: die Messung der Bronchialobstruktion wurde in vitro an lebenden Lungenschnitten (PCLS) etabliert und soll nun an den gängigen In-vivo-Lungenfunktionsmessungen validiert werden. Diese neue Methode zeichnet sich dadurch aus, dass unter Zellkulturbedingungen die Bronchokonstriktion über den Durchmesser der Atemwege mikroskopisch erfasst und mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung quantifiziert werden kann. Die Methode soll für die Testung von Industrie- und Haushaltschemikalien angewendet werden. Hierbei können an den Lungenschnitten eines Tieres mehrere Dosierungen getestet werden. Die erarbeiteten Ergebnisse sollen in internationalen Zeitschriften publiziert werden. Bei erfolgreicher Validierung der Methode soll sie in Zukunft im Forschungszentrum Borstel und im Fraunhofer ITEM/Hannover eingesetzt werden.

### **Kontakt**

Dr. Armin Braun Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin  
Immunologie und Allergologie Nikolai-Fuchs-Straße 1 30625 Hannover Tel.: 0511  
5350 263 Fax.:0511 5350 155 braun@item.fraunhofer.de

Prof. Dr.Stefan Uhlig Lungenpharmakologie  
Forschungszentrum Borstel 23845 Borstel Tel. :  
04537 188 478 Fax.: 04537 188 778 suhlig@fz-  
borstel.de

Avoidance of in vivo lung function measurements in pharmacologic and toxicologic studies

### **Summary**

There is an increasing need to test industrial chemicals and environmental pollutants for their irritant and allergenic potential and measure the associated lung function impairment. Such measurements are performed in vivo and cause substantial distress to the experimental animals involved. The aim of this project is to develop and validate alternative methods to the

current standard of animal experimentation. Replacing in vivo by in vitro testing methods: Measurement of bronchoconstriction has been established in vitro in precision-cut lung slices (PCLS) and shall now be validated by means of established in vivo lung function measurements. The distinguishing feature of this new method is that it allows to microscopically observe the bronchoconstriction under cell culture conditions by means of the airway diameter and quantify it by digital image processing. The method is aimed to be used in the testing of industrial and household chemicals. It allows to test different doses on the lung slices of a single animal. The results of the project work are planned to be published in international journals. If the method can be successfully validated, it will be used in the future at the Borstel Research Center and at the Fraunhofer ITEM, Hannover.

### **Contact**

Dr. Armin Braun Fraunhofer Institut of Toxicology and Experimental Medicine Immunology and Allergology Nikolai-Fuchs-Straße 1 30625 Hannover Germany Tel.: 0511 5350 263 Fax.: 0511 5350 155 braun@item.fraunhofer.de

Prof. Dr. Stefan Uhlig Head Division  
Pulmonary Pharmacology Research Center  
Borstel Leibniz Center for Medicine and  
Biosciences 23845 Borstel Germany Tel.  
04537-188 478 FAX 04537- 188 778  
suhlig@fz-borstel.de

**Verbundprojekt: Validierungsstudie zur Prüfung auf Hautpenetration (Phase II),  
(Phase 2), Teilprojekte 1 – 5**

**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0313338; 0313339; 0313341; 0313342; 0313343**

**Laufzeit: 01.11.2004 bis 31.01.20046**

**Zusammenfassung**

Ziel des Vorhabens ist die Reduktion der Zahl von Tierversuchen zur kutanen Penetration und Permeation von Fremdstoffen durch eine standardisierte In-vitro-Methode. Eine validierte Alternativmethode, basierend auf biotechnologisch gewonnenen, kommerziell verfügbaren humanen Hautmodellen, soll als Ersatz- und Ergänzungsmethode die bei der Entwicklung und Prüfung von Industriechemikalien, Pflanzenschutzmitteln und Arzneimitteln große Zahl der Tierversuche erheblich reduzieren oder gar vollständig ersetzen. Dafür soll nun die kürzlich verabschiedete OECD „Prüfrichtlinie 428“ mit der zugehörigen „Technischen Leitlinie Nr. 28“ für die In-vitro-Prüfung auf Penetration von Fremdstoffen in sowie Permeation durch die Haut auf sog. künstliche menschliche Haut (Rekonstruierte Epidermis) erweitert werden. Eine solche Erweiterung ist bereits ausdrücklich vorgesehen, sofern die Testmethode validiert ist. Angesichts dieses Umstands kann der ursprünglich vorgesehene In-vitro- / In-vivo-Vergleich entfallen. Die Planung des Vorhabens berücksichtigt die grundlegenden Erkenntnisse aus der Phase 1 (Methodenentwicklung, Protokolltransfer) sowie die Empfehlungen der OECD. Dazu gehört insbesondere die Untersuchung einer größeren Zahl von Testsubstanzen, die sich deutlich in ihrer Lipophilie sowie in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Unterschiede in der Permeation verschiedener „Häute“ werden insbesondere durch Infinite-dose-Experimente offenbar, die daher vorzugsweise erfolgen werden. Die abschließenden Finite-dose-Experimente, für die auch eine Massenbilanz erstellt wird, beschränken sich auf zwei exemplarisch ausgewählte Substanzen und ein Hautmodell.

**Koordinatorin:**

Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin  
Königin-Luise-Str. 2+4 D-14195 Berlin

msk@zedat.fu-berlin.de

**Validation study for testing of skin penetration (Phase II) Abstract**

The aim of this project is to reduce the number of animal experiments for the investigation of cutaneous penetration and permeation of compounds by a standardised in vitro approach. The final goal is a validated alternative approach based on biotechnologically obtained and commercially available human skin models to be used for the development and testing of new, or not yet finally characterised chemical entities, such as pesticides and pharmaceuticals. This approach should be capable of critically reducing or abolishing the currently high numbers of so far indispensable animal experiments. It should become feasible by extending the recently published OECD test guideline 428 according to a Suggestion of the corresponding Guidance Document No. 28 for the in vitro quantification of the skin penetration and permeation by compounds to the reconstructed human skin models. Due to the adoption of these documents the in-vitro/in vivo comparison is dispensable. The study

design is based on the fundamental results of Phase 1 (development of the method, protocol transfer) as well as general corresponding recommendations by the OECD. It thus includes testing of several test substances, which widely vary in lipophilicity and molecular weight. Tissue-related variations become obvious from the results of infinite-dose experiments. Finally, finite-dose-experiments including a mass balance will be performed using two selected compounds and one human skin model.

**Coordinator:**

Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting Institut für  
Pharmazie der Freien Universität Berlin Königin-  
Luise-Str. 2+4 D-14195 Berlin

[msk@zedat.fu-berlin.de](mailto:msk@zedat.fu-berlin.de)

**Projekt : „Sphäroid-Based-Screen“: Aufbau einer technologischen Plattform zum Einsatz eines 3D Zellkulturmodells im industriellen Antitumor-Wirkstoff-Screening-Prozess**

**Förderkennzeichen: 0313143**

**Laufzeit: 01.12.2004 – 30.11.2006**

**Zusammenfassung**

Die Zahl mittels modernster Technologien identifizierter, synthetisch hergestellter Wirkstoffkandidaten gegen Tumorerkrankungen steigt seit einigen Jahren stark an und hat - aus ethischen wie ökonomischen Gründen - bereits zu einem Umdenken in den Teststrategien der pharmazeutischen Industrie geführt. Indiz hierfür ist z. B. der zunehmende Einsatz sogenannter „cell based assays“ im frühen Prozess des Wirkstoff-Screening. Die bislang etablierten 2D-Assays reflektieren jedoch die in vivo Situation in vieler Hinsicht nach wie vor unzureichend. Erkenntnisse aus mehr als drei Jahrzehnten Forschung zeigen, dass der Einsatz dreidimensionaler Kulturmodelle im industriellen Screening einen bedeutenden Beitrag zur besseren Auswahl der vielversprechendsten Wirkstoffkandidaten und deren Anwendungsparameter leisten wird, sowohl für die Applikation in Tiermodellen zur Toxizitätsprüfung als auch letztendlich für die direkte Abschätzung klinischer Wirksamkeit (Kunz-Schughart et al., J. Biomol. Screen. 9:273, 2004).

Das vorliegende Projekt der Universität Regensburg (Institut für Pathologie und Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie) beabsichtigt den Aufbau einer technologischen Plattform zum Einsatz dreidimensionaler Zellkulturen, im Speziellen multizellulärer Sphäroide, im ‚High-Throughput-Screening‘ (HTS) nach neuen Anti-Tumor-Wirkstoffen. Ziel des Vorhabens ist die Anpassung dieses seit langem in der Forschung etablierten 3-D Zellsystems an industrielle Anforderungen durch Optimierung, Standardisierung und Adaption von Kulturbedingungen und Analytik. Durch die Zusammenarbeit mit dem Industriepartner Avalon Pharmaceuticals Inc., MD, USA, soll eine Anwender-orientierte Entwicklung der Plattform gewährleistet werden. Die Evaluation des Systems beinhaltet vornehmlich den Einsatz bekannter Kontrollsubstanzen, um eine adäquate Korrelation mit in vivo Daten durchzuführen. Um langfristig die Akzeptanz der Plattform für einen industriellen Einsatz zu erreichen, soll eine weltweit einzigartige Sammlung an Arbeitsprotokollen für Kultivierung und Einsatz multipler Zelllinien in Sphäroidkultur angelegt werden, so dass konzeptionell die Entwicklung einer von Industrie und Wissenschaft nutzbaren Serviceeinrichtung am Standort Deutschland in Form eines Sphäroidkultur- und Datenarchivs möglich ist.

**Ansprechpartnerin:**

PD Dr. Leoni Kunz-Schughart Institut für Pathologie  
Franz-Josef-Strauss-Allee 11 93053 Regensburg Tel.  
0941-944-6647 Fax 0941-944-6602 E-Mail leoni.kunz-  
schughart@klinik.uni-regensburg.de

„Spheroid Based Screen“: Establishment of a technological platform for the application of a 3-D culture model in the industrial anti tumor drug screening process

## **Summary**

The number of new drug candidates for the treatment of solid and metastatic malignancies identified and synthesized via modern high throughput technologies has consistently increased since only a few years. Driven by both ethical and economical incentives, this has already resulted in a shift of the test strategies used by the Pharmaceutical Industry in the early drug development process as reflected by the increased demand for and application of cell based assays. Currently available two-dimensional cell based assays, however, still reflect a highly artificial cellular environment. 3-D culture systems are known to better mimic the in vivo behavior of many cell types and are promising approaches for sophisticated in vitro drug screening. Scientific evidence from the past three decades indicates that these 3-D models can essentially contribute to a more efficient selection of the most promising drug candidates and the treatment modalities prior to and ultimately in place of animal testing (Kunz-Schughart et al., J. Biomol. Screen. 9:273, 2004).

The objective of the project at the University of Regensburg (Institute of Pathology and Department of Pharmaceutical Technology) is to establish an advanced technological platform for the application of the spheroid 3-D culture system for high throughput screening of new anti tumor drug candidates. Our intention is to optimize, adapt and standardize this model system for industrial requirements. Cooperation with the industrial partner Avalon Pharmaceuticals Inc., MD, USA, shall guarantee a user oriented development of the platform. The evaluation of the culture system and platform includes the application of a defined number of well-known control substances/drugs to allow an adequate correlation of in vitro and in vivo data. A unique collection of standardized experimental protocols for the robust application of multiple human tumor cell lines in spheroid culture will build the base both to achieve general acceptance of the platform by the Pharmaceutical Industry and to conceptually provide the service of a spheroid culture and data archive located in Germany.

## **Contact:**

PD Dr. Leoni Kunz-Schughart Institute of Pathology  
Franz-Josef-Strauss-Allee 11 93053 Regensburg  
Germany phone +49-941-944-6647 fax  
+49-941-944-6602 e-mail leoni.kunz-  
schughart@klinik.uni-regensburg.de

**Thema:****"Evaluierung eines interaktiven 3D- Testsystems als Krankheitsmodell der Rheumatoiden Arthritis (in vitro Pannus-Modell) zur effektiven Prüfung von Wirkstoffen"****Projektkoordinator:**

PD Dr. Michael Sittinger Labor für Tissue Engineering Klinik für Rheumatologie und Deutsches Rheumaforschungszentrum Berlin Charité\_ Universitätsmedizin Berlin Tel 030450 513198 Fax 030 450 513943 Michael.sittinger@charite.de

**Kurzfassung:**

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche Gelenkerkrankung, die ca. eine Million Bundesbürger betrifft und große volkswirtschaftliche Bedeutung hat. Das typische Merkmal einer RA ist die rheumatische Gelenkinnenhaut (Synovialmembran), die ein entzündliches Pannusgewebe ausbildet, welches das umliegende Knorpel- und Knochengewebe invadiert und zur Zerstörung des betroffenen Gelenks führt. Die RA ist ein Krankheitsbild des Menschen mit unbekannter Ätiologie. Experimentelle Arthritiden am Tier sind nur sehr bedingt auf den Menschen übertragbar und zudem für eine systematische Analyse von therapeutisch relevanten Wirkstoffen im großen Maßstab problematisch. Konventionelle Zellkulturen berücksichtigen nicht die bei RA wichtigen komplexen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen und sind somit in der pharmakologischen Substanztestung nur wenig aussagekräftig. Mit Hilfe des Tissue Engineering können die Zellen ihre eigene gewebetypische extrazelluläre Matrix ausbilden, so dass deren Funktion bei zellulären Interaktionen erhalten bleiben kann. Diese Techniken wurden verwendet, um ein interagierendes dreidimensionales Zellkulturmodell der Rheumatoiden Arthritis zu etablieren, das sog. in vitro Pannus-Modell. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppen sind die molekularen Muster und Profile bekannt, die die pathologischen Veränderungen der Arthritis charakterisieren. Auf Basis dieser Arthritisassoziierten Profile sollen im Vorhaben Referenzdatensätze erhoben werden, die molekulare Veränderungen durch hoch- im Vergleich zu niedrigwirksame Substanzen beschreiben. Ausgehend von diesen Referenzdatensätzen werden Testsubstanzen auf ihr therapeutisches Potential (hoch oder niedrig) in diesem Pannusmodell geprüft. Dadurch werden umfangreiche Medikamentenuntersuchungen mit komplexem Informationsgehalt in weit früheren Entwicklungsstadien eines Medikamentes möglich, so dass gezielte Auswahlkriterien und damit eine Reduktion von Kandidatenwirkstoffen getroffen werden kann, bevor Tierversuche erforderlich sind.

Title: "Evaluation of an interacting 3D-Testsystem as a Disease Model for Rheumatoid Arthritis (in vitro Pannus-Model) for effective Testing of Agents"

**Coordinator:**

PD Dr. Michael Sittinger Labor für Tissue Engineering Department of  
Rheumatology and German Arthritis Research Center Berlin CharitE\_ -  
Universitätsmedizin Berlin Tel +49 30450513198 Fax +49 30 450  
513943 Michael.sittinger@charite.de

### **Summery:**

The Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic inflammatory joint disease with a population prevalence of approximately 1 %. The RA is characterized by a hyperplastic inflammatory synovial membrane leading to destructive invasion of surrounding cartilage and bone. The RA is a human disease with unknown aetiology. Experimental arthritis in animals only reflects the human situation in a very limited manner. This limits the value of systematic analysis of potential therapeutic agents in animals. Conventional Gell cultures disregard the important and complex cell-cell- and cellmatrix interactions by RA and are consequently less significant in pharmacological substance testing. By means of tissue engineering cells can develop their own tissue-characteristic extracellular matrix to maintain functions in cellular interactions. These techniques were applied to establish an interacting three-dimensional Gell culture model of Rheumatoid Arthritis (in vitro Pannus Model). There are known molecular patterns and profiles from previous own work characterising the pathologic changes in arthritis patients. In this project, reference data will be generated describing the molecular changes of high - in comparison with low efficacy - substances. Based on these reference data, testing of test substances will be performed to evaluate their therapeutic potential (high and low) in this tissue model. Thereby it will be possible to allow drug testing with complex information content in much earlier development stages of drugs leading to efficient selection criteria to reduce candidate agents before animal experiments are necessary.

## **Projekt: Entwicklung eines Tests zur Ablösung von Tierversuchen beim Nachweis von aktivem Pertussis-Toxin in adsorbierten Impfstoffen**

**Förderkennzeichen 0313658**

**Laufzeit: 01.07.2005 bis 31.12.2007**

### **Zusammenfassung**

Entwicklung eines In vitro-Tests zum Nachweis von nativem, nicht entgifteten Toxin des Keuchhusten-Erregers *Bordetella pertussis* (Pertussis-Toxin, PTX) in adsorbierten Impfstoffen. Insbesondere soll die Testung in Endprodukten ermöglicht werden, um die hierzu vorgeschriebenen Tierversuche ablösen zu können. Problemstellung: Für den Einsatz in Impfstoffen muss PTX, welches aus Kulturüberständen von pathogenen *Bordetella pertussis* gewonnen wird, chemisch entgiftet werden. Die Europäische Pharmacopoeia (EP) schreibt vor, danach die Abwesenheit von restlichem, noch aktivem PTX an insgesamt 5 Gruppen von mindestens 5 Mäusen zu bestimmen. Von den Herstellern sowie parallel vom Paul-Ehrlich-Institut (PEI) müssen so jährlich ca. 120 Chargen entsprechender Impfstoffe getestet werden (6000 Tiere pro Jahr). Ein existierender In vitro-Test an Hamster-Ovarialzellen ist für adsorbierte Impfstoffe nicht einsetzbar. Lösungsweg: Der In vitro-Nachweis von aktivem PTX wird über eine Weiterentwicklung des Pyrogentests mit menschlichem Vollblut realisiert. Kürzlich wurde publiziert, dass PTX in humanen Monozyten die Bildung von Tumor Necrosis Factor alpha sowie von Interleukin 12 induziert, welche im Überstand einer Inkubation von PTX mit menschlichem Vollblut gemessen werden können. Die Pyrogen-Forschungsgruppe des PEI hat umfangreichen Versuchsreihen bewiesen, dass der Vollblut-Pyrogentest für die Sicherheitsprüfung adsorbierter Impfstoffe problemlos einsetzbar ist. Geplante Ergebnisverwertung: Das wichtigste Ziel des Projektes ist die Ablösung des Tierversuchs zum Nachweis von PTX durch die Einführung des zu entwickelnden In vitro-Tests in die internationalen Arzneibücher.

### **Summary**

Development of an in vitro assay for the detection of native non-detoxified toxin of the pertussis pathogen *Bordetella pertussis* (pertussis toxin PTX) in adsorbed vaccines.

The objective is to make testing available especially in final products in order to replace the animal experiments which are compulsory for this purpose. Problem: PTX, which is produced from culture supernatants of pathogenic *Bordetella pertussis* must be chemically detoxified for the use in vaccines. The European Pharmacopoeia (EP) stipulates that, after that, the absence of residual still active PTX must be verified in altogether 5 groups of at least 5 mice. Thus, approx. 120 batches of the appropriate vaccines (6,000 animals per year) must be tested by the manufacturers and, simultaneously, by the Paul-Ehrlich-Institut (PEI). An existing in vitro test in ovarian hamster cells cannot be used for adsorbed vaccines. Solution: The in vitro detection of active PTX is realised by developing further the pyrogen test with human whole blood. According to a recent publication, PTX induces the formation of tumour necrosis factor alpha and interleukin 12 in human monocytes. This can be measured in the supernatant of an incubation of PTX with human whole blood. The pyrogen research group of the PEI has proved in comprehensive assay sequences that the whole blood pyrogen test can be used for safety testing of adsorbed vaccines without any problems. Planned use of the result: The most important objective of the project is the replacement of the animal experiment for the

detection of PTX by introducing the in vitro test to be developed in the international monographs.

### **Projektleitung**

Dr. Thomas Montag Lessing und Dr. Michael Schwanig

#### Kontaktadressen

Dr. Thomas Montag-Lessing  
Paul-Ehrlich-Institut D-63225  
Langen Tel. 0049 (0)6103  
778020 email: month@pei.de

Dr. Michael Schwanig  
Paul-Ehrlich-Institut  
D-63225 Langen Tel. 0049  
(0)6103 773600 Email:  
schmi@pei.de

**Projekttitel: „Verbundprojekt: Ersatz des Tierversuchs zum Nachweis der biologischen Aktivität des Botulinum-Neurotoxins und zum Nachweis spezifischer neutralisierender Antikörper, Teilprojekte 1 und 2“**

**Förderkennzeichen: 0313732A und 0313732B**

**Laufzeit: 01.08.2006 bis 31.01.2008**

Projektkoordinator

Prof. Dr. Dr. Helge Böhnelt Georg-August-Universität Göttingen – Fakultät für Agrarwissenschaften – Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen – Abt. Tropentierhaltung und –zucht

Kellnerweg 6 37077  
Göttingen Tel.: 0551 /  
393396 E-mail:  
hboehne@gwdg.de

**Zusammenfassung**

Ersatz des Tierversuchs zum Nachweis der biologischen Aktivität von Botulinum- Neurotoxinen und spezifischer neutralisierender Antikörper. Die therapeutische Verwendung von Botulinum-Neurotoxinen (BoNT) kann durch Antikörper beeinträchtigt werden. Deren neutralisierende Wirkung kann nicht durch serologische Tests sondern nur im Tierversuch oder im Organtest nachgewiesen werden. Als Ersatz für den Tierversuch wird ein Test in neuronalen Zellkulturen erarbeitet, der sowohl für die Chargenkontrolle als auch die Standardisierung von BoNT-Präparaten eingesetzt werden kann. C. botulinum Typ A-Toxin wird aus Fermenterkulturen von Referenzstämmen gewonnen. Verschiedene Reinheitsgrade werden durch Filtration und Säulenchromatographie erzeugt. Die gereinigten Toxine werden mit Standardpräparaten verglichen und gefroren gelagert. Neutralisierende polyvalente Antiseren gegen das Typ-A-Toxin werden in Ziegen gebildet, gereinigt und getestet und als Referenzmaterial aufgearbeitet. Es ist vorgesehen den erarbeiteten Test zum Patent anzumelden. Die Miprolab mikrobiologische Diagnostik GmbH, eine Ausgründung der Universität Göttingen, wird den Test im Auftrag vermarkten und wirtschaftlich verwerten. Beide Projektpartner haben daran einen gleichen Geschäftsanteil.

**Summary**

Replacement of animal tests für biological activity of botulinum neurotoxins and specific neutralizing antibodies testing The therapeutic use of botulinum neurotoxins (BoNT) may be hampered by antibodies. The neutralizing properties of which cannot be measured by serological tests but by animal tests or by tests on animal organs. As replacement, a test in neuronal cell cultures is to be established which is apt as well for batch control and standardization of BoNT preparations. C. botulinum type A toxin will be obtained from reference strains by bioreactor cultures. Different grades of purity will be obtained by filtration and column chromatography. The purified toxins are to be compared with standard

preparations and stored frozen. Blocking polyvalent antisera against type A toxin will be propagated in goats, purified, tested, and made available as reference material. The developed test should be applied für a patent. Miprolab microbiological diagnostic GmbH, a spin-off from Goettingen university, will exploit and commercialise the test, both project partners having an adequate interest in it.

**Projekttitle: In vitro Produktion von humanen monoklonalen Antikörpern****Förderkennzeichen: 0313731****Laufzeit: 01.04.2006 bis 31.03.2009****Zusammenfassung**

Um neue monoklonale Hybridomantikörper herzustellen werden derzeit Mäuse wiederholt immunisiert und die Milz entnommen, wobei meist Freund'sches Adjuvans verwendet wird. Als Ziel unseres Projektes soll auf diese belastenden Tierversuche vollkommen verzichtet werden können, während gleichzeitig der Stand der Technik bei der Herstellung monoklonaler Antikörper verbessert wird. Dazu wollen wir eine Bibliothek von Hybridomzellen herstellen aus der humane Antikörper jedweder Spezifität schnell aufgefunden werden können. Technisch gesehen wird (a) eine Hybridomzelllinie, die zusätzlich zu den sezernierten Antikörpern pro Zelle > 100.000 Membran-gebundene Antikörper präsentiert, durch homologe Rekombinationen so umgebaut, dass (b) anschließend die durch PCR aus der mRNA von B-Lymphocyten gewonnene Vielfalt der Antikörperegene mittels Rekombinasen (z.B. phiC31 int) relativ einfach einkombiniert werden kann. Dabei entsteht eine Schar von Antikörper-produzierenden Zellen, die im FACS nach den gewünschten Antikörperspezifitäten durchsucht werden kann. Mittlerweile ist klar, dass mit dieser Methode 106 bis 108 verschiedene menschliche Hybridome herstellbar sein sollten, was für die Suche nach nahezu beliebigen Antikörperspezifitäten ausreichen sollte.

**Projektkoordinator**

PD Dr. Frank Breitling AG

Chipbasierte Peptidbibliotheken

**Projektpartner**

Dr. Gerhard Moldenhauer AG Molekulare

Immunologie Deutsches

Krebsforschungszentrum Im Neuenheimer Feld

580 Deutsches Krebsforschungszentrum Im

Neuenheimer Feld 280 69120 Heidelberg Tel.:

(06221) 42 4744 69120 Heidelberg Tel. (06221)

42 3750 f.breitling@dkfz.de

g.moldenhauer@dkfz.de

Project title: In vitro production of human monoclonal antibodies

**Summary**

To date animal experiments are indispensable in order to generate monoclonal hybridomas. The procedure comprises recurrent immunisation of mice, until the spleen is finally removed.

In order to get a strong immune response the very encumbering adjuvans according to Freund usually is used. Our project's goal is the replacement of these atrocious animal experiments. At the same time we want to improve the state of the art in the generation of monoclonal antibodies. This is done by the generation of a library of hybridoma cells that should not only yield human monoclonal antibodies of any specificity, but also simplify and shorten screening procedure and affinity maturation. Technically spoken, a hybridoma cell line that presents more than 100.000 membrane-bound antibodies per cell is reconstructed by homologous recombination. Next, the diversity of antibody genes is introduced via specific recombination (e.g. phiC31-int), with the diversity of antibody genes harvested by PCR from mRNA of B lymphocytes. Thereby, many different antibody-producing cells are generated that are easily screened for the desired antibody specificities. The method should enable for the generation of 10<sup>6</sup> to 10<sup>8</sup> different hybridoma cells. Thereby, virtually any antibody specificity should be isolatable from this library.

**Project coordinator**

PD Dr. Frank Breitling AG  
Chipbasierte Peptidbibliotheken

**Project partner**

Dr. med. Gerhard Moldenhauer  
Deutsches Krebsforschungszentrum  
Im Neuenheimer Feld 580 AG  
Molekulare Immunologie Deutsches  
Krebsforschungszentrum 69120  
Heidelberg Tel.: (06221) 42 4744 Im  
Neuenheimer Feld 280 69120  
Heidelberg f.breitling@dkfz.de Tel.  
(06221) 423750  
g.moldenhauer@dkfz.de

**Verbundprojekt: Computersimulationen der Pharmakokinetik im Innenohr nach topischer Medikamentenapplikation an die Rundfenstermembran, Teilprojekte 1 – 3**

**Laufzeit: 1. Oktober 2006 – 30. September 2009**

**Zusammenfassung:**

Innenohrschwerhörigkeit gehört zu den häufigsten chronischen Erkrankungen. Die Ergebnisse der derzeitigen medikamentösen Therapiestrategien insbesondere bei akuten Hör- oder Gleichgewichtsschädigungen bestehen aus einer intravenösen oder oralen systemischen Therapie mit verschiedenen Substanzklassen und sind unbefriedigend. Deshalb wird seit einigen Jahren in Grundlagenforschung und klinischer Anwendung die Strategie der lokalen Medikamentenapplikation an das Innenohr verfolgt. Medikamente werden an die Rundfenstermembran (RFM) gebracht, so dass diese in das Innenohr diffundieren können. Experimente zur Struktur der RFM und zur Diffusion von Stoffen durch die RFM haben gezeigt, dass sich die RFM trotz ihrer Dreischichtigkeit wie eine semipermeable Membran verhält und sogar relativ große Moleküle durch sie hindurch gelangen können. Um diese viel versprechende Therapieform in die klinische Prüfung überführen zu können, werden derzeit noch sehr viele Tierversuche zur Untersuchung der Pharmakokinetik im Innenohr bei verschiedenen Tierspezies, mit verschiedenen Medikamenten und für unterschiedliche Applikationsstrategien bzw. Drug Delivery Systeme durchgeführt. Diese Tierversuche stark zu reduzieren bzw. sogar zu ersetzen, ist das Anliegen des vorgeschlagenen Projekts. Tierversuche sollen durch Computersimulationen ersetzt werden. Dazu werden realistische Modelle der 3D Pharmakokinetik im Innenohr erarbeitet, in Software implementiert und validiert. Neue Drug Delivery Systeme zur lokalen Medikamentenapplikation werden entwickelt und in die Software integriert. Zur Identifikation der notwendigen Gewebeparameter werden eindimensionale Ersatzmodelle erstellt und entsprechende inverse Probleme gelöst. Da pharmakokinetische Untersuchungen am Menschen, wie in der Phase I der klinischen Prüfung üblich, am Innenohr nicht durchgeführt werden können, ist es anzustreben, die Vorhersagen aus den Computersimulationen für die Planung von Phase I-II -Studien zu nutzen. Entsprechende Computersimulationen sollten langfristig systematisch in das Zulassungsverfahren für neue Medikamente des Innenohres und neue Applikationsmethoden am Innenohr einbezogen werden.

**Projektkoordinator:**

Fraunhofer-Institut für Techno- und Wirtschaftsmathematik  
Dr. Norbert Siedow  
Fraunhofer-Platz 1  
D-67663 Kaiserslautern  
Tel.: 0631 / 3 16 00 42 47  
Fax: 0631 / 3 16 00 10 99  
[siedow@itwm.fraunhofer.de](mailto:siedow@itwm.fraunhofer.de)

**Projektpartner:**

Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum  
Tübingen und  
Hörforschungszentrum Tübingen, AG Innenohrpharmakologie  
Dr. med. Stefan Plontke  
Elfriede-Aulhorn-Str. 5  
D-72076 Tübingen  
Tel.: 07071 / 29 88088  
Fax: 07071 / 29 3311  
[Stefan.Plontke@uni-tuebingen.de](mailto:Stefan.Plontke@uni-tuebingen.de)

MCS Micro Carrier Systems GmbH  
Dr. Rudy Susilo  
Stresemannallee 6  
D-41460 Neuss  
Tel.: 02131 / 155 424  
Fax: 02131 / 155 290  
[Susilo@microcarriersystems.de](mailto:Susilo@microcarriersystems.de)

## **Summary:**

### **Computer simulation of drug pharmacokinetics in the inner ear after topical administration**

Worldwide, hearing disorders are among the most frequently encountered chronic diseases. Since therapeutic results using intravenous or oral drug applications remain unsatisfactory, there is a rapidly increasing clinical interest in treating inner ear disorders by means of local drug delivery. Substances applied to the round window membrane enter the scala tympani and from there are distributed within the inner ear. Local drug delivery to the inner ear appears to be the treatment strategy of choice for future inner ear therapies. In order to further develop this therapeutic strategy, large numbers of animal experiments are currently performed worldwide. Due to the small volume of the cochlear fluids, these animal experiments are difficult to perform, are prone to technical artifacts and are difficult to interpret quantitatively, which additionally increases the number of animal experiments. Preliminary experience with a 1D-modelling approach of inner ear pharmacokinetics demonstrated the enormous potential of computer simulations for planning and interpreting pharmacokinetic animal studies. In this project, a 3D-computer model will be developed in order to refine, reduce and in some areas completely replace animal experiments in inner ear research. This will be achieved by developing realistic models of the pharmacokinetics in the inner ear, by implementing them in software, and then validating them by comparison with experimental data. Such computer simulations will become invaluable in the approval process of new drugs and in evaluating application protocols for inner ear therapy. New drug delivery systems for the local drug distribution will be designed and implemented into the software. For identification of tissue parameters used in the simulation asymptotical one-dimensional models will be developed and the corresponding inverse problems will be solved. Since extensive pharmacokinetic studies – as required in phase I clinical trials - are not possible in the human inner ear, the only reasonable alternative is to use a computer model for planning of phase II clinical trials for drug delivery to the human inner ear. In this respect, animal experiments for pharmacokinetic questions can be completely replaced by the development of a sophisticated and validated computer model.

## **Project Coordinator:**

Fraunhofer-Institut für Techno- und Wirtschaftsmathematik  
Dr. Norbert Siedow  
Fraunhofer-Platz 1  
D-67663 Kaiserslautern  
Phone: 0631 / 3 16 00 42 47  
FAX: 0631 / 3 16 00 10 99  
[siedow@itwm.fraunhofer.de](mailto:siedow@itwm.fraunhofer.de)

## **Project Partner:**

Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Tübingen und

Hörforschungszentrum Tübingen, AG Innenohrpharmakologie  
Dr. med. Stefan Plontke  
Elfriede-Aulhorn-Str. 5

D-72076 Tübingen  
Phone: 07071 / 29 88088  
FAX: 07071 / 29 3311  
[Stefan.Plontke@uni-tuebingen.de](mailto:Stefan.Plontke@uni-tuebingen.de)

MCS Micro Carrier Systems GmbH  
Dr. Rudy Susilo Stresemannallee 6  
D-41460 Neuss Phone: 02131 /  
155 424 FAX: 02131 / 155 290

[Susilo@microcarriersystems.de](mailto:Susilo@microcarriersystems.de)

**Projekt: Tierexperimentelle Übungen online: eLearning als Ausbildungsmodul zur standardisierten Qualifizierung von Studierenden und Wissenschaftlern der biomedizinischen Fachdisziplinen als ein Beitrag zum 3R-Konzept.**

**Förderkennzeichen: 0313903**

**Laufzeit: 01.01.2007 bis 30.06.2009**

**Zusammenfassung:**

Forschungsprojekte und Lehrinhalte der Lebenswissenschaften können Eingriffe an lebenden Tieren erforderlich machen. Das Deutsche Tierschutzgesetz schreibt vor, dass Personen, die Tierversuche durchführen die dafür erforderlichen Fachkenntnisse nachweisen müssen. Zu Ausbildungszwecken sollen jedoch nur dort Tierversuche durchgeführt werden, wo das Ziel nicht mit anderen Mittel erreicht werden kann. Obwohl das Tierschutzgesetz als Bundesgesetz in allen tierschutz- und forschungsrelevanten Fragen eine bundesweit einheitliche Regelung vorgibt, wird dies bei der Ausbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses bisher nicht berücksichtigt. Um eine einheitliche Ausbildung zu ermöglichen eignet sich ein modular aufgebautes eLearning - Programm, das in Inhalt und Umfang den Schwerpunkten unterschiedlichen Bedürfnissen angepasst werden kann. eLearning stellt ein wichtiges multimediales Element im Bereich der naturwissenschaftlichen Fächer dar und vermittelt Wissen über Animation und Simulation. So eröffnet es neue Wege des Verstehens komplexer Zusammenhänge. Im eLearning Modul "Tierexperimentelle Übungen *online*" sollen den Studierenden Kenntnisse im tierschutzgerechten Umgang mit Labortieren vermittelt werden. Umfang und Inhalte orientieren sich dabei an den Vorgaben der FELASA. Es sollen vertiefende theoretische und praktische Aspekte tierexperimentellen Arbeitens mit den gängigen Versuchstieren erarbeitet werden. Grundlegende Vorgehensweisen und Techniken zur Planung und Durchführung von Tierversuchen sind hierbei ein tragender Bestandteil. Vermittelt werden weiterführende Kenntnisse über Zucht und Haltung, Handling und Applikation, Narkose und Analgesie, sowie der Beurteilung der Befindlichkeit von Versuchstieren. Einen besonderen Stellenwert wird das Kapitel 3 R's erhalten. Das Erreichen des Lernzieles wird durch eine Lernkontrolle sichergestellt. .

Die Koordination des Projektes erfolgt durch Prof. Gerhard Heldmaier und Dr. Cornelia Exner. Kooperierende Partner sind Bayer HealthCare und die Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung der Universität Heidelberg. Als beratende Partner, die das Projekt begleiten, sind Mitglieder der Senatskommission für tierexperimentelle Forschung der DFG, der GV-Solas und der ZEBET vorgesehen.

**Summary: Tierexperimentelle Übung online: e-learning as a tool for the qualification of students and young research professionals in the biomedical disciplines in accordance to the 3 R concepts**

Life science disciplines may necessitate the use of animals in research and education. The German "Animal Welfare Act" requires professional competency for staff / persons engaged in the use of animals for scientific purposes. Further, experimental animal work in education only allowed where the teaching objective cannot be met by other means. While the Animal Welfare Act as a federal law demands a unitised nationwide regularisation in all aspects of animal welfare and research, there are no consistent specifications for the qualification and academic training of young professionals in laboratory animal work. A modular designed e

learning programme, which will be adaptable to different aspects and study focuses, will assist in the progress of harmonising specialist education. E-learning will be an important tool to mediate knowledge through animation and simulation; and will open new ways of understanding complex concepts in biological sciences. . The e-learning module "Experimental Animal Work *online*" (Tierexperimentelle Übungen *online*) will serve to communicate necessary skills in the humane handling of experimental animals. Content and complexity will be in accordance with the FELASA recommendations on the education and training of persons working with experimental animals. Aspects will include theoretical and practical considerations of experimental animal work with common laboratory animal species. Basics in the design and practice of scientific methods of animal experimentations, as well as federal and European legislation will be an integral part of the programme. Further course studies will emphasise on animal care and husbandry, handling and restraint, minor procedures, anaesthesia and analgesia as well as recognition and assessment of stress and distress in laboratory animals. An additional focus will be on the principle of the 3R's (replacement, refinement and reduction of animal use). Supplementary interactive tests will help facilitate the assessment of the learning objectives for the individual e-learning units. Project coordinators are Prof. Gerhard Heldmaier and Dr. Cornelia Exner. Cooperative partners are Bayer HealthCare and die Interfakultären Biomedizinische Forschungseinrichtung der Universität Heidelberg. Members of the Senate Commission on Animal Protection and Experimentation for the German Research Foundation (DFG), the GVSeIAS and IEBET will act in advisory capacity.

**Verbundprojekt:., Verbundprojekt: Konditionierung und Einsatz hepatischer in vitro Systeme zur Identifizierung von Leber-Karzinogenen mittels Toxicogenomics - Methoden, Teilprojekte A und C Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0313854A und C Laufzeit: 01.05.2007 bis 30.04.2010**

### **Zusammenfassung (Vorhabenziel, Arbeitsplanung, Erfolgsaussichten)**

Toxicogenomics wird aktuell vor allem in vivo eingesetzt, um aus Kurzzeitstudien ein Maximum an Informationen für eine Risikobewertung von Stoffen zu erhalten. Bei Vorliegen von Daten zum toxischen Wirkungsmechanismus kann auf belastende 2-Jahres- Karzinogenitätsstudien und 90 Tage- Studien an Labornagern verzichtet werden. In zunehmendem Umfang vorliegende Daten aus Toxicogenomics- in vivo Studien sollen zur Validierung von potentiell geeigneten in vitro Systemen genutzt werden. Das Projekt soll in zwei Phasen gegliedert werden: Im ersten Abschnitt soll durch den Einsatz von karzinogenen Testsubstanzen ein geeignetes, hepatisches in vitro System entwickelt werden. Dabei werden ausgewählte Zielgene mittels RT-PCR quantifiziert. Eine zweite Phase beinhaltet die Überprüfung der Prädiktivität des Testsystems anhand ausgewählter Modellsubstanzen (gentoxische + nicht-gentoxische Kanzerogene). Eine umfassende Analyse der Genexpression erfolgt anhand von DNA-Microarrays. Der Einsatz von Toxicogenomics in hepatischen in vitro Systemen zur Erfassung karzinogener Stoffeigenschaften würde analoge Möglichkeiten bieten, wie sie derzeit in Form von in vitro Tests auf Mutagenität / Genotoxizität flur genotoxische Kanzerogene existieren. Dadurch könnten Langzeitstudien an Labornagem reduziert werden, für die es gegenwärtig noch keine Alternative gibt.

Kontaktinformation Dr. Axel Oberemm Abteilung  
„Sicherheit von Stoffen und Zubereitungen“  
Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Thielallee  
88-92 14195 Berlin Tel.: 030/8412-3238 eMail:  
axel.oberenim@bfr.bund.de

### **Summary:**

Use of hepatic in vitro systems for detection of liver carcinogens by application of toxicogenomics  
Project outline (aims, working plan, prospects of success) At present, toxicogenomics is mostly used in vivo in order to retrieve comprehensive information from short-term studies. If mechanistic data are available for risk assessment, long-term animal studies for prediction of carcinogenic effects of substances may not be required. Available information from toxicogenomic in vivo studies can be used to validate potential in vitro systems, which may be used to further reduce animal testing. The project follows a tiered-step approach: in a first stage, it is planned to develop a suitable rat hepatic in vitro test System by modulation of cell culture conditions and the use of model car

cinogens. RT-PCR will be used to detect target genes, which were selected on the basis of existing *in vivo* data. In a second stage, the specificity and predictivity of the developed *in vitro* System will be assessed using rat DNA-chips and testing a range of carcinogenic and noncarcinogenic substances. In perspective, this testing approach could aid to differentiate between genotoxic and nongenotoxic substances, filling the gap of existing *in vitro* approaches, which are designed to detect mutagenic effects. This is a prerequisite to replace controversial long-term animal testing for detection of carcinogenic substance properties. Contact person Dr. Axel Oberemm  
Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Department "Safety of Substances and Preparations"  
Thielallee 88-92 14195 Berlin Tel.: 030/8412-3238 eMail: axel.oberemm@bfr.bund.de

**Verbundprojekt „Prävalidierung eines biotechnologisch hergestellten Hornhautmodells für die pharmakokinetische und sicherheitstoxikologische Prüfung“ Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0313913A-D Laufzeit: 01.03.2007 bis 28.02.2009**

### **Zusammenfassung**

Ziel des geplanten Vorhabens ist die Entwicklung einer Alternativmethode zum Kaninchenaugen-Irritationstest nach Draize, basierend auf biotechnologisch gewonnenen, humanen Hornhaut-äquivalenten. Diese Ersatz- und Ergänzungsmethode soll darüber hinaus die zahlreichen Tierversuche zur kornealen Permeation reduzieren. Die von uns entwickelte Methode soll einen konkreten Beitrag zur Schließung der vorhandenen Lücken geplanter Teststrategien zur Bewertung des augenreizenden Potenzials von Substanzen liefern. Während für die Prüfung stark korrosiver Substanzen bereits bewährte *in vitro* bzw. *ex vivo*-Verfahren vorhanden sind, stehen für die Vorhersage der Augenirritation bisher keine ausreichend aussagekräftigen *in vitro* Verfahren für die mild-moderat augenreizenden Substanzen und zur Vorhersage von Persistenz und Reversibilität zur Verfügung. Die von den Antragstellern entwickelten organotypischen Hornhautäquivalente, bestehen aus allen wesentlichen zellulären Komponenten der humanen Hornhaut. In diesem komplexeren Zellsystem, wachsen die verschiedenen Zelltypen in einer Anordnung, wie sie auch *in vivo* vorliegt. Sie stellen wertvolle Instrumente dar, um auf der Basis humaner Zellen Ergebnisse zu erarbeiten, deren Übertragbarkeit auf die Situation im Körper weniger limitiert ist, als die einfacheren Zellkultursysteme oder reiner Epithelmodelle. Das Hornhautmodell verspricht deshalb eine höhere Aussagekraft bezüglich der Vorhersage von Persistenz und Reversibilität eines Augenschadens sowie der transkornealen Permeation von Ophthalmika. Im Rahmen des beantragten Projekts sollen Standardarbeitsanweisungen (SOPs) für die Konstruktion des humanen Hornhautmodells sowie für Untersuchungen zur toxikologischen Prüfung und Permeationsmessung etabliert werden. Die Reproduzierbarkeit der Rekonstruktion des Hornhautmodells und die Transferierbarkeit der Protokolle zur Permeation und Sicherheitstoxikologie sollen überprüft werden.

Das geplante Projekt gliedert sich in 2 Phasen. Die Laufzeit des beantragten Projektes (Phase 1) beträgt 2 Jahre. In der ersten Förderphase steht die Methodenentwicklung im Vordergrund, während im 3. Jahr (Phase 2) eine Prävalidierung unter Beteiligung der Industrie erfolgen soll.

**Sprecherin:**

Dr. Brigitte Rusche Deutscher Tierschutzbund-  
Akademie für Tierschutz Spechtstraße 1 D-85579  
Neubiberg [brigitte.rusche@tierschutzakademie.de](mailto:brigitte.rusche@tierschutzakademie.de)

**Summary**

Aim of the project is the development of an alternative method for the Draize rabbit eye irritation test on the basis of artificial human cornea equivalents. Furthermore, this method has the potential to reduce animal experiments for studying corneal permeation. The method developed by the applicants will contribute to close a gap within proposed test strategies for the safety assessment of cosmetics and industrial chemicals. Whereas testing of corrosive substances can be conducted by well-established in vitro and ex vivo methods, such test methods are still missing for the prediction of persistence and reversibility of mild/moderate irritating substances. The use of organotypic whole cornea equivalents is supposed to give rise to several advantages over the more simple epithelial models. They are reassembled of the same cell types as found in natural human tissue, but consist of immortalised cell lines to ensure reproducibility or to minimise product variation. Full cornea equivalents are constructed by using tissue engineering techniques and comprise an endothelial monolayer, epithelial multilayer and collagen-embedded keratocytes as artificial stroma. By application of these more complex models the transferability of results to the human in vivo situation is enhanced and a higher significance concerning persistence and reversibility of eye irritation and transcorneal permeation can be expected. Objectives of the project are establishing standard operating procedures (SOPs) for the construction of corneal models, as well as for the prediction of drug permeation and eye irritation (relevant toxicological marker). Further tasks are determination of the reproducibility and transferability of the methods. The project is divided in 2 phases. The running time for the first phase is 2 years. Provided that the methods are reproducible and transferable, we will operate a process of prevalidation in cooperation with industrial partners in year 3.

**Corresponding author:**

Dr. Brigitte Rusche German Animal Welfare Federation-Animal  
Welfare Academy Spechtstraße 1 D-85579 Neubiberg  
[brigitte.rusche@tierschutzakademie.de](mailto:brigitte.rusche@tierschutzakademie.de)

**Verbundprojekt: „ Entwicklung von prädiktiven in vitro Tests zur sicherheitstoxikologischen Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität“ Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0313925A-E Laufzeit: 01.05.2007 bis 30.04.2009**

**Zusammenfassung**

Untersuchungen zur Entwicklungsneurotoxizität von chemischen Stoffen werden nach Prüfrichtlinien der U.S. EPA (Test Guideline 870.6300) und dem Entwurf der OECD-Richtlinie 426 durchgeführt. Diese Richtlinien umfassen die Untersuchung der Morphologie des Gehirns der Versuchstiere (in der Regel Ratten), eine Reihe von Verhaltenstests, die Beurteilung der Entwicklung der Jungtiere, die Untersuchung von Biomarkern der Gliosis und Zytotoxizität und die Untersuchung spezifischer Biomarker. Für diese Tests zur Entwicklungsneurotoxizität sind eine sehr große Zahl an Versuchstieren erforderlich, etwa 140 Muttertiere und 1000 Jungtiere, und erstrecken sich über etwa drei Monate. Die Untersuchung der oben beschriebenen Parameter erfordert einen großen technischen und logistischen Aufwand und besonders geschultes Personal. Aus diesen Gründen sind in vivo Tests zur Entwicklungsneurotoxizität extrem arbeitsaufwändig, komplex und kostenintensiv. Derzeit wird diskutiert, den Untersuchungsbereich der Entwicklungsneurotoxizität in das REACH Programm der EU aufzunehmen, bei dem 30.000 Altstoffe toxikologisch bewertet werden sollen. Es ist heute schon abzusehen, dass diese Situation zu einem enormen Anstieg der Versuchstierzahlen im Bereich der Entwicklungsneurotoxizität führen wird. Validierte tierversuchsfreie Alternativmethoden stehen derzeit zur Reduzierung des hohen Tierverbrauches nicht zur Verfügung. Aus den oben genannten Gründen besteht ein dringender Bedarf an der Entwicklung standardisierter und zeitsparender Screening-Tests zur Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität, die auf Zellkulturverfahren basieren und als Alternative zum stark belastenden Tierversuch eingesetzt werden können. Ziel des geplanten Projektes ist die Entwicklung von aussagekräftigen in vitro Tests und einer neuen Teststrategie zur sicherheitstoxikologischen Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität. Dabei sollen verschiedene zellbasierte Modelle eingesetzt werden, die komplementär Teilaspekte der neuronalen Entwicklung in vitro erfassen und damit vielversprechende Ausgangspunkte für die Entwicklung eines in vitro Testsystems für Entwicklungsneurotoxizität bilden. Folgende Zellkultursysteme sollen dabei eingesetzt werden:

- (1) embryonale Stammzellen (Dr. A. Seiler, Dr. K. Hayess; BfR, Berlin und Prof. Dr. A. Schratzenholz, Dr. M. Klemm; ProteoSys AG, Mainz),
- (2) humane fetale neurale Progenitorzellen (Dr. E. Fritsche, Dr. T. Rockel; Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF) an der Heinrich-Heine-Universität gGmbH, Düsseldorf),
- (3) humane Teratocarcinoma Zellen (Prof. Dr. G. Bicker; Physiologisches Institut, Abt. Zellbiologie; Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) und
- (4) verschiedene Zellkultursysteme auf Neuronensensorchips (Prof. Dr. J. Gimsa, Dr. W. Baumann; Institut für Biowissenschaften; Universität Rostock) Zur Beurteilung der neuronalen Entwicklung sollen eine Reihe von molekularen und funktionellen Endpunkten wie Differenzierung, Migration, Proliferation, Apoptose, elektrische Aktivität und Netzbildung etabliert werden. Um von Anfang an eine anwendungsorientierte Herangehensweise und die wissenschaftliche Akzeptanz sicherzustellen, wird die BASF (vertreten durch Dr. W. Kaufmann) als ein Vertreter der Chemischen Industrie und potentieller Anwender die Entwicklung des in vitro Testsystems wissenschaftlich begleiten.

Development of Predictive In Vitro Test for Developmental Neurotoxicity testing Given the significant potential of chemicals and drugs to interfere with development of the nervous system, regulatory test guidelines have been adopted for the prediction and assessment of developmental neurotoxicity (U.S.EPA OPPTS 870.6300 and OECD TG 426). However, current in vivo test methods are laborious, costly and necessitate use of high numbers of laboratory animals. Around 1000 pups have to be handled in an in vivo DNT study and at least 140-mated dams are used to produce enough pups from different litters available to the tests. Moreover, the study design is complex and clear recommendations for optimal methodological approaches in DNT studies are lacking. In addition, under the REACH program of the European Commission it is planned to evaluate approximately 30,000 existing chemicals for their toxicological properties. Prediction of developmental neurotoxic effects is a key feature in the toxicological profile of a compound. This situation will considerably increase the number of laboratory animals. Validated alternative methods for developmental neurotoxicity testing are not available. Thus, standardized, predictive screens for the evaluation of developmental neurotoxicity need to be available with the ultimate goal of increased efficiency in terms of reduced animal use and higher throughput compared to whole-animal testing using the existing guidelines. The final goal of this research proposal is to develop standardized predictive cell-based in vitro assays for developmental neurotoxicity testing. Different complementary cell models which represent selected developmental stages of the developing brain in vivo will be investigated to predict developmental neurotoxicity in vivo from in vitro data. These cell models are:

- (1) embryonic stem cells, (Dr. A. Seiler, Dr. K. Hayess; BfR, Berlin und Prof. Dr. A. Schratzenholz, Dr. M. Klemm; ProteoSys AG, Mainz),
- (2) human neural progenitor cells (Dr. E. Fritsche, Dr. T. Rockel; Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF) an der Heinrich-Heine-Universität gGmbH, Düsseldorf),
- (3) human teratocarcinoma cells (Prof. Dr. G. Bicker; Physiologisches Institut, Abt. Zellbiologie; Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) and
- (4) neuro-sensorchips. (Prof. Dr. J. Gimsa, Dr. W. Baumann; Institut für Biowissenschaften; Universität Rostock) To assess neural development molecular and mechanistic endpoints like differentiation, migration, proliferation, apoptosis and analysis of electrophysiological data will be established. To guarantee an applied and user friendly development of the test systems, a representative from the chemical industry Dr. W. Kaufmann, BASF, Ludwigshafen, Germany, will serve as an external consultant of the joint project.

## **Summary:**

**Projekt „Quantitative molekulare Bildgebung mit spezifischen Ultraschallkontrastmitteln: Reduktion der Versuchstierzahlen durch individuelle Verlaufsbetrachtung pathologischer und therapeutischer Prozesse“ Förderkennzeichen: 0315017 Laufzeit: 01.07.2007 bis 30.06.2009**

**Zusammenfassung:**

Die „Molekulare Bildgebung“ ist eine vielversprechende Technologie zur Darstellung physiologischer und pathologischer Stoffwechselprozesse auf molekularer Ebene. Im Gegensatz zu immunhistochemischen Gewebeuntersuchungen erfolgt die Molekulare Diagnostik in vivo und kann am selben Versuchstier mehrfach durchgeführt werden. Hierdurch kann im Rahmen experimenteller Therapiestudien eine signifikante Einsparung benötigter Tierzahlen erreicht werden. Eine hohe Sensitivität und Spezifität für das molekulare Ziel, eine hohe räumliche Auflösung und die Möglichkeit zur Quantifizierung der Signale sind die Anforderungen, die an diese Methode gestellt werden. Diese Voraussetzungen können durch die Sonographie erfüllt werden, wenn geeignete Kontrastmittel zur Verfügung stehen. Das Ziel dieses Antrags ist daher die Herstellung gasgefüllter polymerstabilisierter Mikrobläschen. Durch die Anbindung von Streptavidin an die Polymeroberfläche erhält man die Möglichkeit biotinylierte Liganden an die Mikrobläschen zu binden. Dies führt zu einem Streptavidin-Biotin Baukastensystem mit dessen Hilfe maßgeschneiderte spezifische Ultraschallkontrastmittel hergestellt werden können. Die Molekulare Bildgebung konzentriert sich jedoch nicht nur auf die Lokalisierung sondern auch auf die Quantifizierung molekularer Marker. Die Etablierung und Weiterentwicklung des SPAQ (Sensitive Particle Acoustic Quantification) Verfahrens zum reproduzierbaren quantitativen Nachweis und die Synthese spezifischer Kontrastmittel für die Ultraschalldiagnostik sind weitere Ziele des Vorhabens.

Koordinator: PD Dr. med. Fabian Kießling Juniorgruppe Molekulare Bildgebung  
Abteilung für Medizinische Physik in der Radiologie Deutsches Krebsforschungszentrum  
Im Neuenheimer Feld 280, D-69 120 Heidelberg phone: +49 6221 422533 e-mail:  
f.kiessling@dkfz.de

**Kontaktinformation der Projektkoordination:** Dr. Andrea Seiler Federal

**Quantitative Molekulare Bildgebung mit spezifischen Ultraschallkontrastmitteln: Reduktion of test animal**

**to Aberrant Experimental Analysis of Pathological and Therapeutic Processes in Molecular Imaging is a**

**Germany (Tel: +49 6221 422533 Fax: +49 6221 422533 E-Mail: a.seiler@dkfz.de)**

**Based on Molecular Imaging is an in vivo technique that can be applied several times on the same**

**test animal. In experimental therapy studies the repeated performance of the measurements results**

**in a significant reduction of test animals. The requirements on this method are a high sensitivity**

**and specificity for the molecular target a high spatial resolution and the possibility to quantify the**

**signals. Sonography fulfills these requirements if adequate contrast agents are available.**

**Therefore, the aim of this project proposal is the synthesis of specific ultrasound contrast-agents**

**which consist of gas-filled polymer-stabilized microbubbles. Linking streptavidin on the surface of**

**the polymer establishes the possibility to bind biotinylated marker on the microbubbles. With the**

**resulting modular construction system specific ultrasound contrast media with varying number of**

**biotinylated docking agents could be established.**

Nevertheless, molecular imaging should additionally quantify the molecular marker. The enhancements and establishment of the SPAQ (sensitive particle acoustic quantification) procedure for the reproducible and quantitative detection of these contrast agents is a further aim of our study. Coordinator: PD Dr. med. Fabian Kießling Molecular Imaging Dept. Medical Physics in Radiology German Cancer Research Center Im Neuenheimer Feld 280, D-69 120 Heidelberg phone: +49 6221 422533 e-mail: [f.kiessling@dkfz.de](mailto:f.kiessling@dkfz.de)

**Verbundprojekt: Reduktion und Refinement der in vivo Forschung an Labortieren unter Anwendung der hochauflösenden und minimalinvasiven Multipinhole-Technik, Teilprojekte 1 und 2**

**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0315016 und 0315016A**

**Laufzeit: 01.09.2007 bis 31.08.2009**

**Zusammenfassung**

Ziel des Projektes *ist* die Validierung und Etablierung der Multipinhole (MPH)-Technik zur Analyse des Rezeptorbindungsverhaltens, des Targeted Delivery und der allgemeinen Bioverteilung von *neuen* Therapeutika in Labortieren. Der vorliegende Antrag verfolgt *die* Absicht, neben dieser biologischen Validierung die Zahl der notwendigen Tiere zu reduzieren und die erreichbare Reduktion quantitativ abzuschätzen. Bisher wurden solche Studien durchgeführt, indem eine große Anzahl an Versuchstieren untersucht und anschließend getötet worden sind, um die Verteilung der Medikamente z.B. autoradiographisch, immunhistochemisch oder durch die Bestimmung der Radioaktivitätsinkorporation in ganze Organsysteme zu ermitteln. Die nicht invasive MPH-Technik ermöglicht es hingegen, in optimaler Weise die Anreicherung von zielgerichteten Therapeutika und Diagnostik an erkranktem Gewebe bzw. Organen von Versuchstieren in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung darzustellen und zu quantifizieren, ohne dass die Tiere dabei getötet zu werden brauchen. Die Bestimmbarkeit einer Zeitkinetik für die allgemeine Organverteilung einer Substanz in ein und demselben Tier wirkt dabei als potenter Einsparmultiplikator, da eine Kinetik ansonsten in separaten aufwändigen Studien mit verschiedenen Tiergruppen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden muss. Zusätzlich kann der Einfluss auf das Zusammenwirken aller Versuchsorgane in vivo beobachtet werden.

Hierzu werden in der Validierungsphase (1. Phase) zunächst alle *neuen* studienspezifischen Hard- und Softwarekomponenten getestet. Anschließend wird in einem **ersten Teilprojekt** die Delivery der von MediGene entwickelten kationischen Liposomen an *das aktivierte* proliferierende Endothel der Blutgefäße von Tumoren (klinische Phase H *Prüfung* für Pankreastumoren) oder der Blutgefäße betroffener Gewebe in inflammatorischen Krankheiten mit der MPH-Technik untersucht. Zur Validierung werden einzelne Organe entnommen, mit einem Szintillationszähler gemessen und mit dem MPH-Daten korreliert. Im **zweiten Teilprojekt** sollen mittels mathematisch beschriebener Modelle die MPH-Daten des Rezeptorbindungsverhaltens quantitativ ausgewertet werden. Zur Validierung dieser Methode sollen  $B_{n7a}$  und  $K_d$  zusätzlich mit der Methode der in vitro Storage Phosphor Autoradiographie (Goldstandard) bestimmt bzw. darüber hinaus gehende Informationen gewonnen werden. Diese Vorgehensweise kann die Anzahl der notwendigen Tiere pro Versuchsreihe um einen Faktor  $h$  (bei dynamischen Studien bis zu einem Faktor 80) reduzieren.

In der zweiten Phase sollen Nanopartikel, monoklonale Antikörper und Nukleinsäuren in Versuchstieren verschiedener Krankheitsmodelle wie im ersten Teilprojekt untersucht werden. Diese Bioverteilungsstudien führen darüber hinaus zur Identifikation der relevanten Zeitpunkte und Organe, die dann in den klassischen Studien analysiert werden und so mindestens zu einer Halbierung der Anzahl der notwendigen Versuchstiere führen.

## Summary

### Reduction and Refinement of in vivo animal experiments using the high resolution and minimal invasive Multipinhole-Technology

Aim of the project is to validate and to explore the Multipinhole (MPH) technology for (1) the analysis of receptor/transporter binding, (2) of the targeted delivery and (3) of the general biodistribution of *new* therapeutics using a small numbers of laboratory animals. So far, studies of receptor/transporter binding, targeted delivery or biodistribution have demanded a large number of experimental animals to be killed and examined autoradiographically, immunohistochemically or by measurement of radioactivity incorporation into whole organ systems. However, the non-invasive MPH technology allows to visualize and quantify the accumulation of radiodiagnostics and therapeutics in specific tissues with a high spatial and temporal resolution, without a need to sacrifice the animals. The possibility to determine repeatedly the time kinetics of radioactivity accumulation at different times in the same animal represent a potent multiplier as far as the reduction of laboratory animals *is* concerned. A further benefit of this approach is the reduction of intersubject variation, as each animal may serve as its own control. Consequently, the performance of MPH studies has the potential to become a valuable alternative to separate large-scale studies with different groups of animals to be sacrificed at different times. Additionally organ interactions and distribution changes can be observed in vivo. In the validation phase (1st phase) all new study-specific hard and software components are tested. In the first subproject the delivery of radio-labeled cationic liposomes (developed by MediGene) to the activated proliferating endothelium of the blood vessels in tumors or the blood vessels inflammation diseases will be quantified in mice with MPH technology. For the purpose of validation, specific organs are dissected, measured with a scintillation counter and correlated with the MPH data. In the second subproject dopamine transporter and D2 receptor binding is quantitatively evaluated in the rat striatum by means of mathematically described models. For the purpose of validation, receptor/transporter density and affinity additionally are determined with in vitro storage phosphor autoradiography. The MPH-procedure can be repeated several times with the same animal and thus reduce the number of necessary animals up to a factor 8 (with dynamic studies divided in e.g. ten time steps up to a factor 80). In the exploration phase the biodistribution of radio-labeled nano-particles, monoclonal antibodies and nucleic acids are investigated in murine models of different diseases. These biodistribution studies will provide information about the time kinetics of delivery and the identification of the relevant times in the target organs, which will be further analyzed in subsequent investigations. This approach will reduce the number of necessary animal experiments at least by 50%.

**Verbundprojekt: QT-Screen RC – Entwicklung eines „high throughput“ Testsystems, basierend auf aus embryonalen Stammzellen von Rhesus-Affen generierten Herzmuskelzellen, für das sicherheitspharmakologische Wirkstoffscreening  
Förderkennzeichen Verbund FKZ 0313926 A + B; Laufzeit: 01.02.2007-31.01.2010**

### **Zusammenfassung**

Ziel des Projektes ist die Entwicklung eines automatisierten *in vitro* Screeningsystems für die sicherheitspharmakologische Testung von Wirkstoffen in Bezug auf ungewollte Effekte auf das Herz / Kreislaufsystem im Sinne des **3R**-Konzeptes. Das System soll langfristig einen erheblichen Teil der derzeit weltweit für das sicherheitspharmakologische Screening von Wirkstoffen durchgeführten Tierversuche ersetzen (**Replacement**). Neben dem direkten Ersatz von Tierversuchen ermöglicht es auch eine deutliche Reduktion der notwendigen sicherheitspharmakologischen Tests, da das „high throughput“- fähige System die vom Gesetzgeber vorgeschriebene Testung schon zu einem frühen Zeitpunkt zulässt (**Reduction**). Im Vergleich zu den z. T. derzeit schon eingesetzten *in vitro* Assays verspricht unsere Neuentwicklung eine wesentlich höhere Datenvalidität im Hinblick auf die Wirkung der getesteten Pharmaka auf das humane Herz (**Refinement**). Wir erwarten, dass dies zu einer sehr viel breiteren *in vitro* Testung schon zu einem frühen Zeitpunkt des Pharmascreeing führen wird, als es unter Verwendung der bisher verfügbaren Assays der Fall ist. Damit verbunden sein wird der frühzeitige Ausschluss vieler Substanzen mit unerwünschten Nebenwirkungen. Dies wird den Tierverbrauch für das sicherheitspharmakologische Screening sowie das Anfallen von Folgekosten deutlich reduzieren. Ein weiteres Einsatzgebiet des Systems liegt im Bereich der toxikologischen Testung von Altstoffen, die im Rahmen eines einheitlichen Rechtssystems (REACH) von der Europäischen Kommission vorgeschlagen ist. Da zur Zeit der größte Teil der toxikologischen Tests auf Tierexperimenten beruht, ist auch hier eine deutliche Reduktion des Tierverbrauchs mit dem hier vorgeschlagenen *in vivo*-nahen *in vitro* Testsystem zu erwarten. Die beabsichtigte Entwicklung basiert auf:

A) Der Verwendung von Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten, KM), die aus embryonalen Stammzellen von Rhesus-Affen (RESCs) differenziert werden. Diese sind menschlichen Zellen sowohl auf molekularer Ebene als auch funktionell ausgesprochen ähnlich, weisen gleichzeitig aber verschiedene Vorteile gegenüber humanen ES-Zellen (HESCs) auf (siehe auch Kap. II).

B) Einem prinzipiell schon technisch ausgereiften und „high throughput“- fähigen System „QT-Screen“ (<http://www.qt-screen.com>, Multi Channel Systems, Reutlingen) zur automatisierten elektrophysiologischen Detektion der Verlängerung des QT-Intervalls in primären Hühnchen-KM. Die Marktakzeptanz dieses Assays ist aufgrund der Tatsache, dass das Huhn für das kardiovaskuläre Wirkstoff-screening kein etabliertes Modell darstellt, leider bisher stark eingeschränkt.

### **Kontaktadresse:**

Prof. Dr. Ulrich Martin Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe (LEBAO) Medizinische Hochschule Hannover Tel.: +49 511 532 8821 Fax: +49 511 532 8819 E-mail: [martin.ulrich@mh-hannover.de](mailto:martin.ulrich@mh-hannover.de)

## **QT-Screen RC – Development of a high throughput assay for pharmacology safety screening**

### **Summary**

Aim of the project is the development of an automated *in vitro* screening system for cardiac safety pharmacology with respect to the 3R concept. In the long term the system will replace a significant proportion of the animal experiments performed in cardiac safety pharmacology (**Replacement**). Besides direct replacement of animal experiments, the system allows for significant reduction of required experiments in safety pharmacology, as the high throughput system permits accomplishment of the mandatory tests already at early time points (**Reduction**). Compared to existing *in vitro* assays, this novel development promises a higher validity of the data with respect to cardiac effects of the tested drugs (**Refinement**). We expect that this will lead to a much broader *in vitro* testing as with existing assays, already during early phases of drug development. Just through exclusion of many substances with undesired side effects at an early stage, wastage of animals for safety pharmacology and consequential follow-up costs can be reduced considerably.

A further application of the system may be toxicologic testing of existing compounds (REACH). As at present the majority of toxicological analyses are based on animal experiments, a considerable reduction of animal experiments can be expected in this field, also.

The envisaged development is based 1) on heart muscle cells generated from rhesus monkey embryonic stem cells and 2) on an already technically fully developed electrophysiological high throughput test system (<http://www.qt-screen.com>, Multi Channel Systems, Reutlingen) for detection of QT-prolongation. Although technically mature, this system is so far not accepted due to the fact that it is based on chicken cardiomyocytes.

**Address for correspondence:** Ulrich Martin, PhD Professor and Head, Leibniz Research Laboratories for Biotechnology and Artificial Organs (LEBAO) Hannover Medical School  
Phone.: +49 511 532 8821 Fax: +49 511 532 8819 E-mail: [martin.ulrich@mh-hannover.de](mailto:martin.ulrich@mh-hannover.de)

## **Verbundprojekt: Zell- und Gewebe-basierte Co-Kultivierungssysteme zur Prognose Haut-sensibilisierender Eigenschaften von Chemikalien**

**Förderkennzeichen: 0315018A + B**

**Laufzeit: 1.07.2007 – 30.06.2010**

### **Zusammenfassung**

Für die Prüfung auf Haut-sensibilisierende (Kontaktallergene) Eigenschaften von Substanzen sind zurzeit von regulatorischen Behörden ausschließlich *in vivo* Prüfungen anerkannt. Ziel des Projektes ist daher die Entwicklung eines *in vitro* Prüfverfahrens, das in eine anschließende Prä-Validierungsstudie Eingang findet.

Bisherige Forschungsergebnisse zeigen, dass das Verhalten dendritischer Zellen der Haut entscheidend für die Sensibilisierung ist und sie das Bindeglied zum Immunsystem darstellen. Sie nehmen Antigene auf, reifen zu immunstimulatorisch kompetenten Zellen und präsentieren die Antigene den naiven T-Zellen. Dieses Wissen um die molekularen Grundlagen der Sensibilisierung machen dendritische Zellen (bzw. ähnliche Zellen) zu einem vielversprechenden Werkzeug, mit dem eine *in vitro* Sensibilisierungsprüfung denkbar wird. Hierbei werden Reifungsmarker dendritischer Zellen nach Substanzkontakt ausgelesen. Bei der Etablierung solcher *in vitro* Sensibilisierungsprüfungen müssen jedoch weitere elementare Hautcharakteristika (z.B. Hautmetabolismus, Zytokineinfluß) in das Modell integriert werden, um die reale Situation in der Haut abzubilden.

Durch die im Projekt zu erarbeitenden Co-Kultivierungssysteme von dendritischen Zellen mit Haut-Gewebekulturen bzw. Keratinozytenzelllinien werden solche Faktoren berücksichtigt. Wesentlich ist hierbei die Integration des organotypischen Hautmetabolismus sowie der Wechselwirkung unterschiedlicher Hautzelltypen miteinander.

### **Kontakt:**

Prof. Dr. August Bernd Zentrum der  
Dermatologie und Venerologie Johann  
Wolfgang Goethe Universität Theodor-Stern-  
Kai 7 D-60590 Frankfurt/M. e-mail:  
[bernd@em.uni-frankfurt.de](mailto:bernd@em.uni-frankfurt.de)

**Summary:**

Due to regulatory acceptance only *in vivo* assays are applicable for skin sensitisation hazard identification of chemicals. Therefore the aim of the submitted project is to develop a new *in vitro* assay which could enter the next step to a validated and accepted alternative method: the pre-validation.

Previous research results demonstrate that dendritic cells of the skin are essential during sensitisation representing the link to immune system. They ingest antigens and mature to immune stimulatory cells which present antigens to naive T-cells. The knowledge about these molecular principles offers the opportunity to use dendritic cells or dendritic-like cells as a promising tool for predicting skin sensitisation. By analysing maturation markers of dendritic cells after substance application a new *in vitro* assay is possible.

By developing such sensitisation models elementary characteristics of the skin have to be considered e.g. skin metabolism and paracrine cell interactions between the main skin cells. These elements should be integrated into an *in vitro* assay for mirroring the real situation in the skin.

Therefore the main subject of this project is the development of co-culture systems of dendritic cells with keratinocytes or skin tissue models which consider these features. Integration of an organotypic metabolism and interactions of skin cells (keratinocytes, fibroblasts, dendritic cells) are fundamental and will be integrated by the chosen approach.

## **Projekt: Entwicklung eines *in vitro*- Testsystems zur Bestimmung des Abbauverhaltens von Knochenersatzmaterialien**

Förderkennzeichen: 0315019

Laufzeit: 01.06.2007 – 30.11.2009

### **Zusammenfassung**

Im Rahmen der Bestrebungen der regenerativen Medizin nach einer „restitutio ad integrum“ sollen Implantatmaterialien, die zur Versorgung größerer Knochendefekte eingesetzt werden, in angemessener Zeit vollständig abgebaut werden. Hier werden zunehmend biokompatible, synthetische Keramiken auf Calciumphosphat (CaP) Basis verwendet. Für die klinische Anwendung ist es z.Zt. jedoch nicht möglich, anhand der Aussagen der Hersteller über die *Abbaubarkeit* ihrer Materialien das für den jeweiligen Patienten am besten geeignete Knochenersatzmaterial (KEM) auszuwählen. Da es bisher keine vorgeschriebene Methode zur Beurteilung der Abbaubarkeit von KEM gibt, werden derzeit zahlreiche und langandauernde (1-2 Jahre) Studien an verschiedenen Tierarten an unterschiedlichen Implantationsorten sowie viele Studien an Patienten durchgeführt. Die Abbaubarkeit basiert auf zwei unterschiedlichen Mechanismen: der Degradation (physikalische Löslichkeit) und der Resorption (zellulärer Abbau durch Osteoklasten). Zur Beurteilung des Abbauverhaltens sind *in vitro*- Degradationsuntersuchungen in Kombination mit zellbiologischen Untersuchungen (Verwendung von Osteoklasten) bisher noch die Ausnahme. Aus diesem Grund soll in diesem Projekt durch Korrelation von *in vitro*-mit *in vivo*- Untersuchungen ein *in vitro*- Testsystem zur Beurteilung des Abbauverhaltens von Knochenersatzmaterialien auf CaP-Basis unter Einbeziehung von Degradation und Resorption entwickelt werden. Zur Beurteilung der Degradation und Resorption *in vitro* sollen am Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien (FBI) an porösen 3-dimensionalen Probekörpern Auslagerungsversuche in physiologischen Lösungen und Osteoklasten-Untersuchungen durchgeführt werden. Parallel hierzu sollen diese Materialien an der Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie in Regensburg im Tierversuch mit Göttinger Mischweinen getestet werden. Die *in vivo*- Degradation soll dabei anhand ektop, die *in vivo*- Resorption anhand im Schädeldefekt implantierter Probekörper bestimmt werden. Mit Hilfe der Daten aus dem Vergleich der *in vitro*- mit den *in vivo*- Ergebnissen kann somit durch *in vitro*-Untersuchungen alleine eine Abschätzung des *in vivo*-Abbauverhaltens von KEM erfolgen. Auf der Basis dieses Zusammenhangs soll in Kooperation der beiden Partner ein *in vitro*- Testsystem entwickelt werden, das auf der Bestimmung der Degradation und der Osteoklasten-Aktivität *in vitro* basiert. Dadurch könnte die Anzahl der Tierversuche und der Belastungsgrad der Tiere zur Untersuchung des Abbauverhaltens von Knochenersatzmaterialien deutlich reduziert werden.

## Summary

Within the efforts of regenerative medicine towards a “restitutio ad integrum”, bone substitute materials that are implanted for the replacement of larger bone defects should be completely degraded within an adequate period of time. Biocompatible, synthetic calcium phosphate ceramics (CaP) are increasingly being used for this purpose. However, in clinical application, it is at present impossible to choose the material best suited for the individual patient following the suppliers information about the degradability of their bone substitute material. Since there are no regulations on standard methods for the determination of degradability up to date, a multitude of long-lasting (1-2 years) studies with varying animals and varying implantation sites, as well as diverse clinical studies on patients are being conducted. Degradation of these materials is based on two different mechanisms, the dissolution (physicochemical) and the resorption (cellular degradation by osteoclasts). In the analysis of the degradation behaviour, the use of *in vitro* degradation studies and cell biological investigations using osteoclasts are still an exception. For this reason, an *in vitro* test system for the determination of the degradation behaviour of bone-substitute materials based on CaP is to be developed within this project, by correlating *in vitro* investigations with *in vivo* studies. For the evaluation of dissolution and resorption *in vitro*, dissolution during storage in physiological media and resorption by osteoclasts will be examined with 3-dimensional porous scaffolds at the Friedrich-Baur-Research Institute for Biomaterials (FBI). The combination of the results from dissolution and resorption studies gives the *in vitro* degradation rate of the bone substitute material. In parallel, the same samples will be used in animal studies with ‘Göttinger Minipigs’ by the Department of Oral and Maxillofacial Surgery (OMF-Surgery, Regensburg). The dissolution *in vivo* will be estimated from ectopic implants, while sample bodies implanted into cranial defects will serve to determine the resorption *in vivo*. By using the data from the comparison of the results *in vitro* and *in vivo*, it will be possible to assess the behaviour of a bone substitute material *in vivo* from *in vitro* studies. Based on this link, in cooperation of the two partners FBI and OMF-Surgery, it is planned to develop an *in vitro* test system, which will be based on physico-chemical degradation and osteoclast activity *in vitro*. This could significantly reduce animal testing and strongly decrease the degree of strain on the animals in the remaining tests.

## Projektleitung

Prof. Dr. G. Ziegler, Dipl.-Ing. M.Sc. R. Detsch

## Kontaktadressen

Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien  
Universität Bayreuth Ludwig-Thoma-Str. 36c 95447  
Bayreuth

Dr. Dr. J. C. Roldán, Oberarzt Klinik für Mund-,  
Kiefer- und Gesichtschirurgie Josef-Strauß-Allee  
11 93053 Regensburg

## **Verbundprojekt: Prävalidierungsstudie zur Prüfung der toxischen Wirkung von inhalativ wirksamen Stoffen (Gase) nach Direktexposition von Lungenzellen des Menschen an der Luft-/Flüssigkeitsgrenzschicht**

**Förderkennzeichen: 0313963 A, B, D, E**

**Laufzeit: 01.10.2007 – 31.03.2009**

### **Zusammenfassung**

Mit der Neugestaltung des europäischen Chemikalienrechtes REACH („Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals“) ergibt sich die Notwendigkeit, für alle neuen und bereits auf dem Markt vorhandenen Stoffe, die einer Registrierung bedürfen, toxikologische Daten unter Berücksichtigung der Expositionssituation vorzulegen. Für Stoffe, die auf inhalativem Wege aufgenommen werden erfordert dies umfangreiche und aufwendige inhalationstoxikologische Prüfungen, die mit herkömmlichen Methoden in absehbarer Zeit nicht geleistet werden können. Die REACH Verordnung sieht aber vor, nach Möglichkeit auf Tierversuche zu verzichten und fordert neben der gemeinsamen Nutzung von Prüf- und Versuchsdaten die Nutzung von alternativen Testmethoden, die im Bereich der Inhalationstoxikologie aber bislang fehlen. Ziel des Vorhabens ist daher die Reduktion von Tierversuchen bei der Bestimmung der Zyto- und Genotoxizität von inhalierbaren Industriechemikalien, durch eine von uns etablierte In-vitro-Methode, die in Anlehnung an die In-vivo-Situation, eine standardisierte Direktexposition von Lungenzellen des Menschen (Zelllinie A549) mit einem nativen Prüfgas gewährleistet. Angesichts der Risikoabschätzung werden hier generell Untersuchungen mit Zellen des Respirationstraktes vom Menschen favorisiert. Auf der Grundlage des erarbeiteten Datenmaterials werden unter Einbeziehung von Tierversuchsdaten (Literaturdaten) Analysen zum Zusammenhang zwischen In-vitro- und In-vivo-Studien und die Entwicklung eines Prädiktionsmodells (PM) durchgeführt. Die Erkenntnisse aus dieser auf dem Prävalidierungskonzept von ECVAM beruhenden Studie sollen in einer 2. Phase, für die ein separater Antrag auf Förderung (2 Jahre) vorgelegt wird, entsprechend den wissenschaftlichen Ansprüchen der OECD validiert werden.

Kontaktinformationen des Projektkoordinators:

Dr. J.W. Knebel

Fraunhofer Institut ITEM

Nikolai-Fuchs-Str. 1

30625 Hannover

Tel. 0511-5350-0

Fax. 0511-5350-155

e-mail: knebel@item.fraunhofer.de

### **Summary**

#### **Prevalidation study to test the toxic effects of inhalable substances (gases) after direct exposure of human lung cells at the air/liquid interface**

Following the reorganisation of the European chemicals legislation REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals), toxicological data taking into account the exposure situation need to be provided for all new and existing substances that require registration. For inhalable substances, this requirement can be met only by means of extensive and laborious inhalation toxicological tests, which cannot be accomplished with traditional methods in the foreseeable future. The REACH programme though asks for animal experiments to be avoided as far as possible and, in addition to the sharing of test

and experimental data, stipulates the use of alternative testing methods, which, however, are as yet not available in the field of inhalation toxicology. The aim of this project, therefore, is a reduction of animal experiments in the cyto- and genotoxicity assessment of inhalable industrial chemicals by providing an established in vitro method which, in accordance with the in vivo situation, guarantees a standardised direct exposure of human lung cells (cell line A549) to a native test gas. In view of the risk assessment, investigations using cells from the human respiratory tract are generally favoured in this context. Based on the data material obtained and taking into account existing data from animal experiments (literature data), analyses will be performed regarding the relation between in vitro and in vivo studies and a prediction model (PM) will be developed.

In a second phase, the results of this study, which is based on the prevalidation concept of ECVAM, are to be validated according to the scientific requirements of the OECD. A separate application for funding (2 years) will be submitted for this second phase.

Contact:

Dr. J.W. Knebel  
Fraunhofer Institut ITEM  
Nikolai-Fuchs-Str. 1  
30625 Hannover  
Tel. 0511-5350-0  
Fax. 0511-5350-155  
e-mail: knebel@item.fraunhofer.de

**Verbundprojekt: Optimierung des Genexpressions-Danio rerio-Embryotests (Gen-DarT) als Ersatzmethode für chronische Fischtests (Gen-DarT2)**

**Förderkennzeichen: 0315190A, B, C**

**Laufzeit: 01.03.2007 – 28.02.2011**

### **Zusammenfassung**

Im Rahmen der Umweltrisikoprüfung für die Zulassung von Chemikalien, Pflanzenschutzmitteln, Bioziden und Pharmaka werden akute und chronische Fischtests durchgeführt. Bisher steht mit dem *Danio rerio* Embryotest (*DarT*) nur eine Ersatzmethode für akute Fischtests zur Verfügung. Ziel des vom BMBF geförderten Projekts Gen-*DarT* (Genexpressions *Danio rerio*-Embryotest, 10/2003-12/2006) war es, durch Nachweis Schadstoff-sensitiver Markergene ein Prädiktionsmodell für chronische Fischtoxizität zu entwickeln. Durch die Analyse der differentiellen Genexpression konnte die Testempfindlichkeit für die meisten untersuchten Substanzen im Vergleich zu den konventionellen Endpunkten des *Danio rerio*-Embryotests deutlich erhöht werden und war vergleichbar mit den Effektkonzentrationen in chronischen Fischtests wie dem *Fish early life stage* Test. Unabhängig vom Projekt Gen-*DarT* wurden am Forschungszentrum Karlsruhe im Projekt *Zebrafish Toxicogenomics* Genexpressionsmuster mit einer hohen Substanz-Spezifität für die Exposition im Zebrafischembryo identifiziert. Auch für niedrige Expositionskonzentrationen, die keine morphologisch sichtbaren Veränderungen hervorriefen, konnten signifikante Veränderungen auf transkriptioneller Ebene beobachtet werden. Beide Projekte belegen das hohe Potential von Gen-*DarT* als Ersatzmethode für chronische Fischtest und werden im Fortsetzungsprojekt Gen-*DarT2* zusammengeführt. Dabei stehen die Anwendung erweiterter Mikroarrays für die Identifizierung zusätzlicher Markergene sowie die Entwicklung eines Multiplex-Verfahrens für den simultanen Nachweis der Expression einer Vielzahl von Genen im Vordergrund. Hierzu werden 10 Modellsubstanzen und 20-30 Testsubstanzen, die ein verschiedene Toxizitäts- und Wirkungsspektrum sowie entsprechende Negativ-Substanzen (Substanzen mit sehr geringer chronischer Toxizität) umfassen, eingesetzt. Ziel ist die Optimierung von Gen-*DarT* zur

Erfassung eines möglichst breiten Wirkungs- und Toxizitätsspektrums. Durch die Untersuchungen soll ein Vorschlag für die Erstellung einer Prüfrichtlinie für Gen-DarT als Ersatzmethode für chronische Fischtests erstellt werden. Mit Blick auf die erwartete Zunahme der Anzahl von Tierversuchen durch die Umsetzung der neuen EU-Richtlinien für die Zulassung von Chemikalien (REACH) besitzt Gen-DarT ein Einsparpotential in der Größenordnung von jährlich 10.000 – 100.000 Versuchsfischen (für Deutschland). Gen-DarT2 ist ein Verbundprojekt des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung (Department für Zelltoxikologie), des Forschungszentrums Karlsruhe (Institut für Toxikologie und Genetik) und der ECT Oektoxikologie GmbH.

#### Kontaktinformation

*Projektkoordinator:* Dr. Stefan Scholz, Helmholtz Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ, Department für Zelltoxikologie, Leipzig

Email: stefan.scholz@ufz.de

## Summary

### Optimisation of the gene expression *Danio rerio* embryo test (Gene-DarT) as replacement method for chronic fish tests (Gen-DarT2)

#### Summary

Acute and chronic fish test are performed for the registration of chemicals, pesticides, biocides and pharmaceuticals. Up to now, a replacement method is only available for acute fish tests using the *DarT* (*Danio rerio* embryo toxicity test). Thus, the BMBF-funded project Gene-*DarT* (*Danio rerio* embryo toxicity test) aimed at the increase of the sensitivity of the *DarT* by additional analysis of the expression of exposure-sensitive marker genes. Measurement of the gene expression should predict chronic toxicity. Indeed, gene expression analysis has led to an increase of sensitivity close to effect concentrations for classical endpoints in chronic toxicity tests such as the *Fish early life stage* test. An independent study at the Research Centre Karlsruhe (project *zebrafish toxicogenomics*) demonstrated specific gene expression patterns for embryos exposed to various model compounds. Significant alterations were already observed at concentrations that did not cause any morphological disorders. Thus, both projects indicate the high potential of Gene-*DarT* as a replacement method for chronic fish tests. In the follow-up project Gene-*DarT*2 these projects will be combined. The focus will be on the application of extended microarrays for the identification of additional marker genes as well as the development of a multiplex method for an effective expression analysis of a large set of genes. Therefore, 10 model and 20-30 different test compounds with a broad range of toxicity and mode of actions including negative compounds with very low chronic toxicity will be used. The aim is the optimisation of Gene-*DarT* in order to detect a wide variety of compounds with different mode-of-actions and toxicity degree. The proposed research project aims to complete the development of Gene-*DarT* as alternative testing method and to establish suggestions for appropriate testing guidelines. With respect to the expected increase in animal experiment due to the new EU-legislation for the registration of chemicals (REACH) the reduction potential of Gene-*DarT* is estimated in the order of 10,000 to 100,000 individuals per year (for Germany). Gene-*DarT*2 is a cooperation project of the Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ (Department of Cell Toxicology), the Research Centre Karlsruhe (Institute of Toxicology and Genetics) and the ECT Oekotoxikologie GmbH.

#### Contact

*Project coordinator:* Dr. Stefan Scholz, Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Department of Cell Toxicology, Leipzig  
Email: stefan.scholz@ufz.de

**Verbundprojekt: Entwicklung eines Biotransformationssystems für die metabolische Aktivierung von validierten In-vitro-Systemen zur Prüfung auf Embryotoxizität**

**Förderkennzeichen: 0315208A, B, C, D, E**

**Laufzeit: 01.07.2008 – 30.06.2011**

#### Zusammenfassung

Zur Untersuchung von Arzneimitteln und Chemikalien auf Embryotoxizität kommen Tierversuche zum Einsatz. Sie sind zeitaufwendig, kostenintensiv und stark belastend für die Versuchstiere. Die In-vitro-Embryotoxizitätstests „Embryonic Stern Cell Test (EST)“ und

„Whole Embryo Culture Test (WEC)“ sind vielversprechende Alternativmethoden zur Reduktion der Tierversuche. Für ihre Anwendung muss aber die Möglichkeit zur metabolischen Aktivierung von Testsubstanzen integriert werden, um auch das embryotoxische Potential von Proteratogenen nachweisen zu können.

Im Rahmen des Verbundprojektes soll die Kombination des EST und der WEC mit Biotransformationssystemen basierend auf primären Hepatozyten des Schweins bzw. NeoHep-Zellen, gewonnen aus Monozyten des Menschen etabliert werden. Die „Gold“-Standards der In-vitro-Biotransformationssysteme, die primären Hepatozyten der Ratte bzw. des Menschen dienen als Vergleich für die Optimierung und Standardisierung.

Im Rahmen des Verbundprojektes werden Expertisen der In-vitro-Embryotoxizitätstest und Biotransformationssysteme zusammengebracht. Die Expertise für Embryotoxizitätstests wird vom Bundesinstitut für Risikobewertung (Dr. Andrea Seiler, Berlin) für den EST und von der Charité — Universitätsmedizin Berlin (Dr. Stephan Klug und Dr. Burkhard Flick) für die WEC eingebracht. Die Kompetenz für die Biotransformationssysteme werden von der Martin-Luther-Universität Wittenberg (Prof. Dr. Bruno Christ) für die Hepatozyten des Schweins, von der Technischen Universität München (Prof. Dr. Andreas Nüssler, MRI) für die NeoHep-Zellen und von der BASF AG (Dr. Eric Fabian und Dr. Hennie Kamp, Ludwigshafen) für die Hepatozyten der Ratte dargestellt.

Die Weiterentwicklungen dieser In-vitro-Embryotoxizitätstests wird ihre Akzeptanz als Ersatzmethode zu den etablierten Tierversuchen zur Prüfung des reproduktionstoxikologischen Potentials von Xenobiotika signifikant erhöhen.

#### **Kontaktirformation der Projektkoordinatoren:**

Charite — Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
Garystr. 5  
14195 Berlin  
Deutschland  
Prof. Dr. med. Ralf Stahlmann  
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin Garystr. 5  
14195 Berlin

Tel.: ++ 30 8445 1770  
Telefax: ++ 30 8445 1763  
Homepage: [www.charite.de](http://www.charite.de)

#### **Summary**

#### **Development of a Biotransformation System for the Metabolic Activation of Validated In Vitro Test Systems to Identify Embryotoxicity, Subordinated projects 1-5 Reference numbers of subordinated projects: 0315208A bis E**

The embryotoxic potential of drugs and chemicals is assessed by animal testing. These tests are time-consuming, expensive and could cause pain and distress to the animals. The embryonic stem cell test (EST) and the whole embryo culture (WEC) are potential alternative methods to reduce animal testing. However, their implementation in test strategies is limited by missing tools of test compound biotransformation to active metabolites and thereby to identify the embryotoxic potential of proteratogenes.

The aim of this project is to establish a combination of the EST and WEC with a biotransformation system based an primary porcine hepatocytes or NeoHep cells generated from human monocytes. The development, optimization and standardization of activating systems using these cells will be performed in comparison to the corresponding *in vitro* biotransformation systems using primary hepatocytes of rats or humans (golden standard).

In order to realize this project the different experts for *in vitro* embryotoxicity tests and biotransformation systems are going to participate. The Federal Institute of Risk Assessment (Dr. Andrea Seiler, Berlin) is the competent partner as far as the EST is concerned and the Charit -- Universitätsmedizin Berlin (Dr. Stephan Klug and Dr. Burkhard Flick) for the WEC. The experts for the biotransformation systems come from the Martin-Luther-Universität Wittenberg. Prof. Dr. Bruno Christ is responsible for the porcine hepatocytes. Prof. Dr. Andreas Nüssler (Technischen Universität München, MRI) is specialized in NeoHep-cells and Dr. Eric Fabian and Dr. Hennicke Kamp (BASF AG, Ludwigshafen) are responsible for the rat hepatocytes.

The improvement of the two embryotoxicity test systems by implementation of a biotransformation system will increase their acceptance significantly in terms of estimating the reproductive toxicological potential of xenobiotica.

#### **Contact Coordinators of the Joint Project:**

Charite — Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology  
Garystr. 5  
14195 Berlin  
Germany  
Prof. Dr. med. Ralf Stahlmann

Tel: +49 (0)30 8445 1770

Fax: +49 (0)30 8445 1763

#### **Projekt: Entwicklung eines Tests für die Ablösung von Tierversuchen bei der Prüfung auf Abwesenheit von aktivem Pertussis-Toxin in adsorbierten Impfstoffen**

**Förderkennzeichen: 0315216**

**Laufzeit: 01.04.2008 – 31.03.2010**

#### **Zusammenfassung**

Entwicklung eines In vitro-Tests für die Ablösung von Tierversuchen bei der Prüfung auf Abwesenheit von nativem, nicht entgifteten Toxins des Keuchhusten-Erregers *Bordetella pertussis* (Pertussis-Toxin, PTX) in adsorbierten Impfstoffen. Insbesondere soll die Testung in Endprodukten ermöglicht werden, um die hierzu vorgeschriebenen Tierversuche ablösen zu können. Problemstellung: Für den Einsatz in Impfstoffen muss PTX, welches aus Kulturüberständen von pathogenen *Bordetella pertussis* gewonnen wird, chemisch entgiftet werden. Die Europäische Pharmakopoe (EP) schreibt vor, danach die Abwesenheit von restlichem, noch aktivem PTX an insgesamt 3 Gruppen von mindestens 5 Mäusen zu bestimmen. Von den Herstellern sowie parallel vom Paul-Ehrlich-Institut (PEI) müssen so jährlich ca. 350 Chargen entsprechender Impfstoffe getestet werden (10.000 Tiere pro Jahr). Ein existierender In vitro-Test an Hamster-Ovarialzellen ist für adsorbierte Impfstoffe nicht einsetzbar. Lösungsweg: In diesem Testansatz soll die enzymatische Hydrolyse von NAD<sup>+</sup> durch PTX als Indikator für dessen Aktivität genutzt werden. Das NAD-Derivat, NAD<sup>+</sup>, ist ein Fluorogen. Durch die Hydrolyse des fluoreszierenden etheno-NAD<sup>+</sup> zu etheno-ADP-Ribose durch PTX wird eine Fluoreszenzsteigerung hervorgerufen. Dieses auf

den Kern der PTX-Wirkung reduzierte Testsystem schließt Störgrößen weitestgehend aus. Geplante Ergebnisverwertung: Das wichtigste Ziel des Projektes ist die Ablösung des Tierversuchs zum Nachweis von PTX durch die Einführung des zu entwickelnden In vitro-Tests in die internationalen Arzneibücher.

### **Summary**

#### **Development of an in vitro assay for the detection of native non-detoxified toxin of the pertussis pathogen *Bordetella pertussis* (pertussis toxin PTX) in adsorbed vaccines.**

The objective is to make testing available especially in final products in order to replace the animal experiments which are compulsory for this purpose. Problem: PTX, which is produced from culture supernatants of pathogenic *Bordetella pertussis*, must be chemically detoxified for the use in vaccines. The European Pharmacopoeia (EP) stipulates that, after that, the absence of residual still active PTX must be verified in altogether 3 groups of at least 5 mice. Thus, approx. 350 batches of the appropriate vaccines (10,000 animals per year) must be tested by the manufacturers and, simultaneously, by the Paul-Ehrlich-Institut (PEI). An existing in vitro test in ovarian hamster cells cannot be used for adsorbed vaccines. Solution: In this approach, the enzymatic hydrolysis of NAD<sup>+</sup> by PTX shall be used as indicator for the activity of the latter. The NAD<sup>+</sup> derivative, 1,N 6-etheno-NAD<sup>+</sup> is a fluorogen. Hydrolysing fluorescent etheno-NAD<sup>+</sup> into etheno-ADP-ribose by PTX creates an increase in fluorescence yield. This assay system which is reduced to the core of the PTX effect will largely function without interference. Planned use of the result: The most important objective of the project is the replacement of the animal experiment for the detection of PTX by introducing the in vitro test to be developed in the international monographs.

### **Projektleitung**

Dr. Thomas Montag-Lessing und Dr. Michael Schwanig

### **Kontaktadressen**

Dr. Thomas Montag-Lessing  
Paul-Ehrlich-Institut  
D-63225 Langen  
Tel. 0049 (0)6103 778020  
Email: month@pei.de  
Dr. Michael Schwanig  
Paul-Ehrlich-Institut  
D-63225 Langen  
Email: schmi@pei.de

### **Verbundprojekt: HET-MN (Hen's Egg Test — Micronucleus Induction) als Alternativmethode zur *in vivo* Mikrokernprüfung an Nagern**

**Förderkennzeichen: 0315278A, B**  
**Laufzeit: 01.07.2008 – 30.06.2010**

### **Zusammenfassung**

Die Bildung von Mikrokernen ist ein weit verbreiteter und akzeptierter Endpunkt bei der Mutagenitätsprüfung. Die Ermittlung der Mikrokernbildungsrate *in vivo* ist elementarer Bestandteil von Testbatterien/Teststrategien zur Beurteilung der Genotoxizität und wird weltweit von Behörden zur Bewertung der Chemikaliensicherheit empfohlen (OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test).

Der Mikrokern-Test wird auch an zahlreichen nicht-Säugetern und *in vitro*-Testsystemen durchgeführt. Die *in vitro* Mutagenitätsprüfung an angebrüteten Hühnereiern wurde von Prof. Dr. Dr. Niels-Peter Lüpke und PD Dr. Thorsten Wolf an der Universität Osnabrück entwickelt. Bei diesem Test kommt ein komplexes alternatives Testsystem zur Anwendung, das den etablierten Parameter Mikrokernbildungsrate ausliest. Im Rahmen des HET-CAM findet das Modell des angebrüteten Hühnereies seit längerem Anwendung zur toxikologischen Absicherung lokaler und antiinflammatorischer Effekte. Im Vergleich zu derzeit existierenden *in vitro* Prüfungen nutzt der HET-MN ein komplexeres biologisches System, welches die Toxikokinetik der Prüfsubstanz einbezieht (z.B. Aktivierung und Eliminierung von Prüfsubstanzen). Im angebrüteten Hühnerei können Fremdstoffe detoxifiziert und in den Allantoissack ausgeschieden werden. Hier können Proben entnommen werden, was weitere Untersuchungen zur Kinetik der Prüfsubstanz erleichtert. Der Test ist einfach durchzuführen. Bisherige Vorarbeiten zeigen eine hohe Empfindlichkeit und eine hohe Spezifität. Der HET-MN stellt somit eine viel versprechende Alternativmethode dar, um den derzeit etablierten *in vivo* Mikrokern-Test am Nager zu ersetzen.

Das Projekt ist in zwei aufeinander folgende Phasen unterteilt. In der ersten Phase wird die Prüfmethode mit dem Ziel optimiert, eine robuste Standardarbeitsanweisung zu entwickeln, welche in der zweiten Projektphase eingesetzt werden kann. Wesentlicher Bestandteil der zweiten Projektphase ist ein Ringversuch, bei dem die Reproduzierbarkeit und Variabilität der Ergebnisse in unterschiedlichen Laboratorien untersucht wird. Ziel ist die erarbeitete Standardarbeitsanweisung zu optimieren, so dass die Methode Eingang in eine Prävalidierung finden kann.

In dem Projekt werden Daten zur Empfindlichkeit, Spezifität als auch zur Reproduzierbarkeit von Ergebnissen der HET-MN Methode erhoben und damit der nächste Schritt in der Entwicklung zur anerkannten Alternativmethode vorbereitet: die Prävalidierung.

Projektkoordinator

Priv.-Doz. Dr. Thorsten Wolf, Universität Osnabrück, Fb8, Pharmakologie und Toxikologie, Albrechtstr. 28, D-49069 Osnabrück, Tel.: +49-541-969-2422, FAX: +49-541-969-2444, twolf@uos.de

### **HET-MN (Hen's Egg Test — Micronucleus Induction) as an alternative method to the *in vivo* micronucleus assay with rodents**

Summary:

The formation of micronuclei (MN) is a widely used and accepted endpoint of genotoxicity testing. Evaluation of micronucleus frequency *in vivo* is the primary test with mammals in a battery of genotoxicity tests and is recommended by the regulatory agencies around the world to be conducted as part of chemical safety assessments (OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test).

The micronucleus test has been adopted for a variety of non-mammalian- and *in vitro*-assay systems e.g. incubated hen's eggs. The *in vitro* genotoxicity test with incubated hen's eggs was developed at the University of Osnabrück (Germany) by Niels-Peter Lüpke and Thorsten Wolf. This assay uses the well known read-out (induction of micronuclei) with a complex alternative mode! — the hen's egg = which is already in use (eg HET-CAM). Compared to currently used *in vitro* assays, the HETMN uses a more complex test system, which considers the toxicokinetic characteristics of the test substances (e.g. metabolic activation and elimination). The avian embryo is able to detoxify and excrete xenobiotics into the allantoic sac. From there substances can be easily obtained, which enables toxicokinetic studies. The model is easy to handle and initial experiments indicate a high sensitivity as well as a high specificity. This model is a promising alternative method for a replacement of the current *in vivo* micronucleus assay.

The project is divided in two phases. During phase 1 the assay is optimized with the aim to develop a robust standard operating procedure for phase II. During phase II we will analyse inter-lab reproducibility with the aim to further improve the protocol for a subsequent prevalidation.

This project will generate more data about the sensitivity, specificity as well as interlab reproducibility of the HET-MN and opens the door for the next stage towards an approved alternative method: the pre-validation.

Project coordinator:

Priv.-Doz. Dr. Thorsten Wolf, Universität Osnabrück, Fb8, Pharmakologie und Toxikologie, Albrechtstr. 28, D-49069 Osnabrück , Tel.: +49-541-969-2422, FAX: +49-541-969-2444, [twolf@uos.de](mailto:twolf@uos.de)

**Verbundprojekt: Validierung der Mikrodialyse im Blut und im Zielgewebe zur Bestimmung der Konzentrations-Zeitverläufe von pharmazeutischen Prüfsubstanzen.**

**Förderkennzeichen: 0315201**

**Laufzeit: 01.05.2008 bis 30.04.2010**

**Zusammenfassung**

Die Verteilung von Medikamenten im Organismus ist nur im Tierversuch bestimmbar. Es stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die teilweise invasiv (Biopsie), semiinvasiv (Mikrodialyse) oder nicht invasiv sind (PET, MRT). Am häufigsten jedoch sind Letalversuche, bei denen Tiere zu einem definierten Zeitpunkt nach Arzneimittelapplikation getötet werden, um anschließend die Verteilung der Substanz in den unterschiedlichen Geweben zu messen. Pro Tier kann also nur eine einmalige Bestimmung durchgeführt werden.

Die Mikrodialyse ermöglicht mehrere Untersuchungszeitpunkte pro Tier. Über eine implantierte Sonde wird kontinuierlich Gewebsflüssigkeit gewonnen, in der die Konzentration der Testsubstanz gemessen wird. Mit Hilfe dieser Konzentration lässt sich nach Validierung der Methode die tatsächliche Konzentration im Gewebe errechnen. Eine solche Validierung ist jedoch bisher nur für das Mittelohr beschrieben worden.

In diesem Projekt soll die Validierung der Mikrodialyse im Pankreaskarzinommodell der Ratte unter Verwendung ausgewählter Pharmaka (Suramin, Docetaxel, Gemcitabine) erfolgen. Durch die Etablierung der Mikrodialyse soll eine signifikante Reduktion der Zahl an Versuchstieren erreicht werden.

Das Modell soll in vitro und anschließend in vivo durch Retrodialyse und Dauerinfusion überprüft werden. Dadurch soll ermöglicht werden, die am Tier erhobenen experimentellen Daten zur Korrektur der erhobenen Konzentrations-messungen heranzuziehen, so daß sich die dann etablierte Methode zur Validierung der Mikrodialyse auf beliebige Gewebe in weiteren Tiermodellen übertragen ließe.

**Kontakt**

PD Dr. med. H. G. Hotz

Charité Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

Chirurgische Klinik I (Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie)

Hindenburgdamm 30

12200 Berlin

[hubert.hotz@charite.de](mailto:hubert.hotz@charite.de)

030/8445-2541

Validation of microdialysis in blood and in target organs to obtain concentration-time profiles for pharmaceutical test compounds.

**Summary**

The distribution of drugs within the organism can only be determined in animal experiments. Several different methods may be used. These methods are partly invasive (biopsy), semi-invasive (microdialysis), or non invasive (PET, MRI). However, the most common methods are lethal experiments, in which the animals are sacrificed at a defined point of time after drug administration in order to measure the drug distribution in different tissues thereafter. Thus, only a single determination of the drug per animal can be performed.

Microdialysis allows for measuring several points of time per animal. Tissue fluid can be continuously taken by means of a probe which measures the concentration of the substance to be tested. After validation, this concentration offers the possibility of calculating the actual concentration within the tissue. Up to now, such a validation is only described for the middle ear.

This project aims to validate the microdialysis procedure in a pancreatic cancer model of the rat by the use of defined pharmaceuticals (Suramin, Docetaxel, Gemcitabine). The objective of

this project is a significant reduction of the number of animals used to examine the distribution of drugs. First of all, the model should be evaluated in-vitro followed by in-vivo experiments using retro-dialysis and permanent infusions. As a result of these studies, the experimental data gained from in-vivo experiments can be applied to correct the concentration measurements. Thus, the established method to validate the microdialysis procedure may be transferred to various tissues and animal models.

## **Projekt Versuchstiersparende Qualitätskontrollen kryokonservierter Spermatozoen von Mausmutanten**

**Förderkennzeichen: 0315152**

**Laufzeit 1.3.2008 bis 28.2.2010**

### **Zusammenfassung**

Transgene Tiere sind einmalige gezielte Mutanten von hohem wissenschaftlichem Wert, die nur mit großem Aufwand generiert und charakterisiert werden können. Um transgene Linien vor Verlust zu schützen und um eine reine Erhaltungszucht zu vermeiden hat sich die Kryokonservierung bewährt. Als Alternative zur Kryokonservierung von Embryonen steht die Kryokonservierung von Spermatozoen zur Verfügung. Beide Techniken bieten verschiedene Vor- und Nachteile, man muss im Einzelfall über die adäquate Strategie entscheiden. Die Kryokonservierung bietet derzeit den vermutlich wichtigsten Zugang, um bei transgenen Experimenten und Haltungen Tiere einzusparen.

Ein zentraler Punkt ist die Qualität der eingefrorenen Proben nach dem Auftauen. Deren Kontrolle ist von größter Bedeutung, da nur so die Qualität überprüft und somit auch bestimmt werden kann, wann eine transgene Linie so sicher und ausreichend konserviert wurde, dass auf eine Weiterzucht ohne Gefahr des Verlustes verzichtet werden kann.

Der bisher übliche Standard zur Kontrolle kryokonservierter Spermatozoen ist eine *in-vitro*-Fertilisation mit anschließendem Embryotransfer, die sehr aufwändig und mit einem hohen Tierverbrauch verbundenen ist. Zweck dieses Vorhabens ist eine Technik zu etablieren, die diese Kontrollen in Zukunft weitgehend ohne Tierverbrauch möglich macht. Die wesentlichen Parameter einer Qualitätskontrolle der Spermatozoen (Dichte, Motilität, Morphologie und Lebensfähigkeit) sollen mit einer speziellen Färbetechnik effizient untersucht werden.

Mit dem im Rahmen dieses Projektes beschafften Fluoreszenzmikroskops samt der dazugehörigen Auswertesoftware werden zunächst die am besten geeigneten (Fluoreszenz-) Farbstoffe ermittelt, um in einem Arbeitsgang lebende und tote Spermatozoen sowie deren Motilität identifizieren zu können. Mit Hilfe der Auswertesoftware wird dann die Qualität der Proben bestimmt und gleichzeitig eine Aussage zu Morphologie und Dichte der jeweiligen Probe gemacht. Hierzu ist die Feinjustierung und Validierung der Methode nötig. Gleichzeitig werden parallele *in-vitro*-Fertilisationen vorgenommen. Die erhaltenen Daten werden vergleichend ausgewertet und zum Erstellen einer Richtlinie zur Qualitätskontrolle genutzt.

Ziel ist, diese Technik als Goldstandard für die Qualitätskontrolle kryokonservierter Spermien zu etablieren um mit relativ geringem Aufwand eine verlässliche Aussage über die jeweilige kryokonservierte Probe machen zu können.

Im DKFZ wurden bisher 200 transgene Mauslinien kryokonserviert. Bei reiner Erhaltung müssten jährlich mindestens 40.000 Tiere nur für diesen Zweck gezüchtet werden. Für die Tiere belastend kommen Markierung der Tiere und Entnahme von Biopsien zur Genotypisierung hinzu. Zudem wird so die Belegung von mindestens 600 Käfigen permanent eingespart. Somit trägt die Kryokonservierung wesentlich zum Tierschutz und zur „3R“-Systematik von Russel und Burch bei.

### **Summary**

Transgenic animals are unique mutants exhibiting an enormous scientific potential. Great efforts have to be put into generation and characterization of those mutants. To protect transgenic lines against loss and to omit a permanent breeding to keep these lines in stock, even if they are out of any current experimental use, pre-implantation embryos and/or spermatozoa of these animals can be cryopreserved. Both techniques exhibit assets and drawbacks; the better strategy has to be chosen individually. Cryopreservation has to be considered as the major saving potential of mice of transgenic lines.

The quality control of cryopreserved samples is a crucial requirement, because this is the only way to determine, whether or not a transgenic line has to be estimated as sufficiently preserved and further breeding becomes unnecessary. The common technique to assess cryopreserved spermatozoa is the performance of a complex and animal consuming *in-vitro*-fertilization and subsequently an embryo transfer.

In this project will validate a microscopy based technique to assess the major parameters of sperm quality (morphology, motility, viability, density). Following the staining with fluorescent dyes the spermatozoa are investigated microscopically and the data obtained are analyzed with suitable software. In parallel test- *in-vitro*-fertilization will be done. The comparison of the data received by both techniques will be used to set standards for quality assessment of cryopreserved spermatozoa without the need of additional animals for control purposes.

So far, 200 transgenic mouse lines are cryopreserved at DKFZ by now. If these lines would be kept in a breeding nucleus, 40.000 extra animals would be delivered per year occupying 600 cages. Subsequently cryopreservation is an essential way to improve animal welfare and a contribution to the 3R's.

### **Projektleitung**

PD Dr. Johannes Schenkel, Dipl.-Biol. Heinrich Bürgers

### **Kontaktadresse**

PD Dr. Johannes Schenkel  
Deutsches Krebsforschungszentrum  
Kryokonservierung W430  
Im Neuenheimer Feld 280  
69120 Heidelberg  
j.schenkel@dkfz.de

**Verbundprojekt: Entwicklung eines Verfahrens zur in-vitro-Generierung von monoklonalen Antikörpern mit Hilfe von dendritischen Zellen, Teilprojekte 1 - 3**

**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0315279A, 0315279B, 0315279C**

**Laufzeit: 01.08.2008 bis 31.07.2010**

**Kurzfassung:**

Für die Anwendung im Menschen vorgesehene Antikörper müssen in der Regel humanisiert werden, um ungewollte Immunreaktionen zu vermeiden. Als Ziel dieses Projektes soll eine neue Methode zur Antikörperherstellung entwickelt werden, die es ermöglicht, solche Antikörper ohne den Einsatz von Tieren herzustellen. Gleichzeitig wird dabei die Technik der Herstellung monoklonaler Antikörper, insbesondere auch die von rekombinanten Strategien, entscheidend verbessert. Auf der Basis von dendritischen Zellen (DC) soll ein neues *in-vitro* Verfahren etabliert werden, welches es ermöglicht, Spezies-spezifische, insbesondere humane, monoklonale Antikörper zu generieren. Dies soll durch die gezielte Beeinflussung der Antigenaufnahme in die DC erreicht werden. Als Antigen soll exemplarisch das Prion-Protein verwendet werden, da es natürlicherweise in verschiedenen biochemischen Zustandsformen vorkommt. Unser Lösungsansatz basiert auf einer Technologie, die vollständig auf aus Blut isolierten Immunzellen (DC, T-Zellen, und B-Zellen) beruht. Dieser Ansatz ist durch neue verbesserte Methoden zur Isolierung von spezifischen Immunzellen möglich geworden, und bezieht neueste immunologische Erkenntnisse über die Regulation der adaptiven B-Zell Antwort (z.B. Toll-like Rezeptoren) mit ein. Im Detail soll gezeigt werden, daß mit der Methode Spezies-spezifische, monoklonale Antikörper des IgG Subtypes „nur aus Blut“ hergestellt werden können und daß weiterhin möglich ist, Antikörper gegen eine spezielle räumliche Zustandform des Prion-Proteins herzustellen.

Development of an *in-vitro*-system for generation of monoclonal antibodies with the help of dendritic cells

**Summary:**

The current technology used for generation of monoclonal antibodies includes immunization of animals. Furthermore antibodies for human use have to be humanized to circumvent unwanted immunological reactions. The main goal of the proposed project is to develop a new method for generation of such antibodies without immunizing animals, while improving current monoclonal antibody production technics, especially recombinant strategies. Based on dendritic cells (DC) an *in-vitro* system will be developed to generate species-specific antibodies, especially human monoclonal antibodies. That will be accomplished by specifically direct the antigen uptake into the DC. The prion-protein will be used as model antigen because it exists in different biochemical conformations. The technology will be working solely with immune cells (DC, T-cells and B-cells) obtained from blood. The availability of new methods now routinely used for isolation of specific immune cells and new immunological knowledge of B-cell activation (e.g. toll-like receptors) is making the development of the proposed technology possible. It will be demonstrated in detail that a "blood-born cell only" technology enables the generation of species-specific monoclonal antibodies of the IgG-Type and that antibodies directed against specific conformations of the prion-protein can be produced.

**Koordinator:**

Prof. Dr. Dr. W. Lücke, Deutsches Primatenzentrum Gesellschaft mit beschränkter Haftung - Leibniz-Institut für Primatenforschung, Kellnerweg 4, 37077 Göttingen

**Projekttitle: „In vitro-Kultur von *Schistosoma mansoni* – Kulturschale statt Säugetierendwirt“**

**Förderkennzeichen: 0315277**

**Laufzeit:**

**01.09.2008 bis 31.08.2011**

**Zusammenfassung:**

Ziel unseres Vorhabens ist es, die *in vitro*-Kultur von Schistosomen so zu optimieren, dass sich Schistosomula (d.h. Larven) *in vitro* komplett bis zum erwachsenen Parasiten inklusive Ablage reifer, infektiöser Eier entwickeln. Wir wollen damit alle Entwicklungsstadien des Parasiten aus dem Säugetier in die Kulturschale verlegen. Parallel dazu wird die Technik der Kryokonservierung (des schonenden Einfrierens) lebender Schistosomen optimiert und eine Schistosomenbank aufgebaut. Dies gestattet den bedarfsgemäßen Zugriff auf infektiöse Stadien des Parasiten und macht die permanente Unterhaltung des Lebenszyklus des Parasiten in Versuchstieren überflüssig.

Weltweit sind ca. 200 Millionen Menschen mit z.T. lebensbedrohlichen Folgen an Schistosomiasis erkrankt und noch weitaus mehr davon gefährdet. In den betroffenen Ländern, darunter wirtschaftlich potente Schwellenländer wie China, Brasilien und Südafrika, besteht somit ein großes Interesse an einer wirksamen Therapie und Prävention dieser Erkrankung. Die Entwicklung und Optimierung der *in vitro*-Kultur von Schistosomen soll dazu beitragen, die deutlich absehbare Flut an Tierversuchen zur Erforschung dieser Parasiten pro-aktiv und nachhaltig zu reduzieren bzw. zu ersetzen.

Mit der *in vitro*-Kultur wird ein hoch-effektives Instrument für parasitologische und immunologische Fragestellungen zur Verfügung stehen, das es ermöglicht, u.a. den Effekt potentieller neuer Pharmaka gegen Schistosomen im high-throughput-Verfahren zu testen. Im Gegensatz zum Tierversuch (= *black box*, „Ein-Punkt“-Messung) gestattet die *in vitro*-Kultur die kontinuierliche Beobachtung des Parasiten und damit den gezielten Zugriff auf jedes beliebige Entwicklungsstadium sowie die Registrierung von morphologischen Veränderungen nach Wirkstoffzugabe in Echtzeit. Die daraus resultierende präzise Aussage wird neben der Einsparung von Versuchstieren wesentlich zur Verbesserung des Kosten-Leistungsverhältnisses in der Schistosomenforschung beitragen.

**Kontakt:**

PD Dr. med. Helmut Haas

Zelluläre Allergologie

Forschungszentrum Borstel

D-23845 Borstel

Tel: +49 (0) 4537 188-440

Fax: +49 (0) 4537 188-608 E-

Mail: hhaas@fz-borstel.de

**Partner:**

Dr. Cornelis H. Hokke,

Department of Parasitology

Center for Infectious Diseases

Leiden University Medical Center

PO Box 9600  
2300 RC Leiden  
The Netherlands  
Tel: +31 (0) 71 526 5065  
Fax: +31 (0) 71 526 6907  
E-Mail: C.H.Hokke@lumc.nl

Prof. Dr. Christoph G. Grevelding  
Institut für Parasitologie  
Justus-Liebig-Universität Giessen  
Rudolf-Buchheim-Str. 2  
D-35392 Giessen  
Tel: +49 (0) 641-9938466  
Fax: +49 (0) 641-9938469  
E-Mail: [Christoph.Grevelding@vetmed.uni-giessen.de](mailto:Christoph.Grevelding@vetmed.uni-giessen.de)

### **„*In vitro* culture of *Schistosoma mansoni* – culture dish instead of mammalian host”**

#### **Summary**

Our project aims at optimising the *in vitro* culture of schistosomes in such a way that their complete development from infectious larvae up to adult parasites including deposition of mature, infectious eggs is achieved in the culture dish instead of the mammalian final host. In parallel, the technique of cryoconservation (i.e. gentle freezing) of live schistosomes will be optimised along with establishment of a Schistosome bank. This will allow the needbased access to infectious stages of the parasite and makes the permanent maintenance of the parasite life cycle in laboratory animals redundant.

Approx. 200 million people worldwide are suffering from Schistosomiasis partly with life-threatening consequences and still far more are endangered from it. The affected countries, among them potent newly industrialising economies such as China, South-Africa and Brazil, have a genuine interest in an effective treatment and prevention of this disease. The development and optimisation of the *in vitro* culture of schistosomes shall pro-actively and lastingly reduce/prevent the foreseeable flood in animal experiments for studying this parasite.

With the *in vitro* culture a highly effective tool for parasitological and immunological studies will be available which among others will allow testing potential new drugs against schistosomes by high-throughput procedures. In contrast to animal experiments (= black box, "one-point" measurement), the *in vitro* culture makes a continuous monitoring of the parasite feasible and, thus, allows access to each developmental stage as well as real time recording of morphological changes following e.g. addition of drugs. The resulting precise information shall contribute to both saving experimental animal lives and improving the cost efficiency ratio in schistosome research.

**Contact:**

PD Dr. med. Helmut Haas Cellular Allergology

Research Center Borstel D-23845 Borstel

Germany

Tel: +49 (0) 4537 188-440 Fax: +49 (0) 4537 188-608 E-Mail:

[hhaas@fz-borstel.de](mailto:hhaas@fz-borstel.de)

**Partners:**

Dr. Cornelis H. Hokke,

Department of Parasitology Center for Infectious Diseases Leiden

University Medical Center PO Box 9600

2300 RC Leiden

The Netherlands

Tel: +31 (0) 71 526 5065

Fax: +31 (0) 71 526 6907

E-Mail: [C.H.Hokke@lumc.nl](mailto:C.H.Hokke@lumc.nl)

Prof. Dr. Christoph G. Grevelding

Institute for Parasitology Justus Liebig University Giessen Rudolf-

Buchheim-Str. 2 D-35392 Giessen

Germany

Tel: +49 (0) 641-9938466 Fax: +49 (0) 641-9938469

E-Mail: [Christoph.Grevelding@vetmed.uni-giessen.de](mailto:Christoph.Grevelding@vetmed.uni-giessen.de)

**Projekttitle: „Verbundprojekt: Pluripotente Stammzellen in der automatisierten Prädiktion von Entwicklungsosteotoxizität, Teilprojekte 1 bis 3“**

**Förderkennzeichen:**

**0315121 A, B, C**

**Laufzeit:**

**01.01.2008 bis**

**31.12.2010**

**Zusammenfassung:**

Skelettale Missbildungen zählen zu den häufigsten angeborenen Anomalien und sind weitestgehend auf Kontakt mit Umweltchemikalien und Einnahme von Medikamenten während der Schwangerschaft zurückzuführen. Präklinische Tierversuche sollen bei der Einführung neuer chemischer Verbindungen Aufschluss auf embryoschädigende Nebenwirkungen geben. Etwa die Hälfte der Tiere wird zur Evaluation von Knochentoxizität herangezogen. Zur Einsparung von Tierversuchen, sieht das vorliegende Projekt deshalb vor, einen *in vitro* Ersatztest zur Prädiktion von Osteotoxizität zu entwickeln, den Osteo-ToxAB. Dieser Test könnte durch Verwendung pluripotenter Stammzellen von nicht-humanen Primaten und multipotenter humaner Stammzellen aus Nabelschnurblut voraussichtlich eine hohe Prädiktivität erreichen. Durch *in vitro* Kultivierung und Differenzierung der Zellen zu Osteoblasten in automatisierbaren Bioreaktoren ist ferner angestrebt, menschliches Handling so weit wie möglich zu reduzieren, was eine weitere Erhöhung der Prädiktivität zur Folge hätte.

**Verbundprojektkoordinatorin:**

Dr. Nicole! zur Nieden

Gruppenleiterin Angewandte

Stammzelltechnik Fraunhofer Institut für

Zelltherapie & Immunologie 04103

Leipzig

Tel: +49-341-355 36 260

Fax: +49-341-355 36 1 09

**Summary of Project**

**Pluripotent Stem Cells in Automated Screening for Developmental Osteotoxicity** Skeletal deformities account for most of the congenital birth defects and can be induced by environmental chemicals as well as use medication during pregnancy. Preclinical trials in animals are currently required to investigate embryotoxic side effects in the development of new chemical entities. About half of the animals used in such toxicity tests are evaluated for Bone toxicity. To reduce the volume of animal testing, our project therefore plans to develop an *in vitro* replacement test, "OsteoToxAB", for the screening of developmental osteotoxicity. This test could presumably achieve better toxicologic predictive value through the use of pluripotent primate stem cells and/or multi-potential human cord blood cells. Furthermore, through *in vitro* cultivation and differentiation of the cells into osteoblasts in fully contained automated bioreactors, human handling will be

significantly reduced, which would allow further increases in predictivity.

Contact: Dr. Nicole I. zur Nieden  
Group Leader Applied Stem Cell Technology  
Fraunhofer Institute for Cell Therapy &  
Immunology Deutscher Platz 5e

04103 Leipzig, Germany

Tel: +49-341-355 36 260

Fax: +49-341-355 36 109

## **„Mikrofluidischer *in vitro* Metabolismus“**

**Förderkennzeichen: 0315383**

**Laufzeit: 01.01.2009 bis 31.12.2011**

### **Zusammenfassung:**

Dieses Projekt ist eine Konzeptstudie mit der geprüft werden soll, ob sich der in der Leber von Säugern stattfindende Metabolismus mithilfe kostengünstiger Chipsysteme simulieren lässt. Hierzu sollen mikrofluidische Reaktoren entwickelt werden, in denen mehrere aufgereinigte metabolisch aktive Enzyme (CYP3A4, CYP2B, CYP2C19 und Phase II Enzyme, wie UDPGlucuronosyltransferase, Glutathion-S-Transferase, Sulfotransferase) gerichtet angeordnet sind. Die Anordnung der Enzyme erfolgt durch Selbstorganisation auf der Basis kurzer DNA Oligonucleotide. Die Enzymanordnungen werden von einer laminaren Strömung modellhafter Wirkstoffe (Testosteron, Dextromethorphan, u.a.) umspült, so dass ein schrittweiser Metabolismus der Substrate stattfindet. In dieser Machbarkeitsstudie sollen anhand ausgewählter Kombinationen von verschiedenen Enzymen die technischen Parameter eruiert werden. Eine langfristige Perspektive besteht darin, dass mithilfe des hier vorgeschlagenen mikrofluidischen Metabolismus auf Chipsystemen das Ziel realisiert werden kann, komplexe Interaktionen von 15 und mehr Enzymen nachzustellen, welche in ihrer Gesamtheit den Metabolismus der Hepatozyte wiedergeben. Falls dies gelingt, wäre ein deutliches Einsparpotential für Versuchstiere gegeben.

Projektleiter:

Prof. Dr. Christof M. Niemeyer  
Technische Universität Dortmund, Fakultät  
Chemie Biologisch-Chemische  
Mikrostrukturtechnik Otto-Hahn-Str. 6, Chemie-  
Gebäude C2-07/330 D-44227 Dortmund,  
Germany  
Tel.: Int + 49 (0)231-755 7080; Fax: (0)231-755  
7082 Email: [chri stof.niemeyer@tu-dortmund.de](mailto:chri stof.niemeyer@tu-dortmund.de)  
<http://www.chemie.uni-dortmund.de/niemeyer>

### **Short Summary: "Microfluidic *in vitro* Metabolism"**

This project concerns a proof-of-concept study to evaluate the potential of low-cost microfluidic chip systems for the emulation of complex metabolic processes occurring in mammalian liver. To this end, microfluidic reactor systems will be developed, which contain several purified metabolic enzymes (phase I enzymes, i.e., CYP3A4, CYP2B, CYP2C19 and phase II enzymes, such as UDP-Glucuronosyltransferase, Glutathion-S-Transferase, Sulfotransferase). The enzymes are site selectively immobilized within the microfluidic channel by means of DNA-directed self-assembly, such that a laminar flow of Substrates (model drugs, such as Testosteron, Dextromethorphan) consecutively overflows the individual enzymes. This leads to a stepwise metabolic conversion of the drug. In this proof-of-concept study, selected enzyme combinations will be used to evaluate feasibility and technical parameters of such microsystems. On the long term scale, this concept of microfluidic metabolism should enable the generation of programmable chip systems, operating 15 and more different enzymes, and thus, are capable to mimic the complex metabolic processes occurring in hepatocytes. This would lead to significant reduction in animal testing procedures.

**Verbundprojekt: Charakterisierung der metabolischen Kapazität von *in-vitro*-Hautmodellen zum Zwecke der Identifizierung eines optimalen Modells für die Hauttoxizitätsprüfung sowie zur Expositionsabschätzung von Substanzen mit dermalen Biotransformation, Teilprojekte 1-5**

**Förderkennzeichen: 0315226A, 0315226B, 0315226C, 0315226D, 0315226E**

**Laufzeit: 01.02.2009 – 31.01.2011**

**Zusammenfassung**

Die derzeit erhältlichen 3D-Modelle menschlicher Haut oder Epidermis sind für die Toxikologie hauptsächlich hinsichtlich ihrer Barriereigenschaften und Eignung für die toxikologische Testung auf Ätzung, Reizung und Photoirritation gut charakterisiert und validiert. Ziel des geplanten Projektes ist es daher, eine wissenschaftlich solide Basis für die organotypische *in vitro* Testung der Toxizität von Stoffen mit topischer Exposition für diejenigen toxikologischen Endpunkte zu schaffen, bei denen die metabolische Konversion in der Haut einen relevanten Einfluss auf das Ergebnis hat. Dazu werden zunächst verschiedene *in vitro* Hautmodelle bezüglich ihrer metabolischen Kapazität vergleichend charakterisiert. Anhand der gewonnenen Resultate von sorgfältig ausgewählten Referenzsubstanzen werden geeignete Modelle identifiziert bzw. in Abhängigkeit der Fragestellung optimiert. Das Hautmodell, welches die Situation menschlicher Haut *in vivo* bezüglich ihrer metabolischen Leistungen am besten repräsentiert, wird identifiziert und abschließend in den toxikologischen Endpunkten Zytotoxizität und Genotoxizität geprüft. Der Zeitplan des Projektes sieht vor, in den ersten 18 Monaten für die Referenzsubstanzen die erforderliche Analytik zu etablieren und den Metabolismus an 3D-Hautmodellen und humanen Zellen in Kultur im Vergleich zu Humanhaut *ex vivo* zu untersuchen. Neben der Erfassung der eigentlichen Metabolitenprofile werden zur Verifizierung der metabolischen Kapazität *in vitro* Toxizitätstests durchgeführt. Zu allen Methoden werden Standardprotokolle etabliert, die in den Monaten 19-24 in alle beteiligten Labors transferiert werden, um die Inter-Laborvarianz zu ermitteln. Mit dem optimierten Testverfahren soll dann im dritten Jahr eine Prävalidierung der Alternativmethode erfolgen. Dafür wird später ein separater Antrag vorgelegt.

**Kontaktadresse**

PD Dr. Dr. Andreas Luch  
Bundesinstitut für Risikobewertung  
Thielallee 88 – 92  
14195 Berlin  
Tel: 030-8412-4538  
Email: [andreas.luch@bfr.bund.de](mailto:andreas.luch@bfr.bund.de)

**Summary**

To date, reconstituted 3D models of human skin and epidermis used in toxicology have mainly been characterized regarding their barrier function and validated for the use in *in vitro* tests for skin corrosion, skin irritation and photoirritation. Therefore, the goal of our project lies in the characterization of commercially available full-thickness skin models and reconstituted human epidermis regarding their metabolic capacity toward toxification or detoxification of chemicals and drugs. This further requires comparison to corresponding capacities of permanent skin cell lines, immortalized skin cells or skin preparations *ex vivo*. Six reference compounds have been carefully selected and their effects will be tested in various skin models on i) expression of metabolizing enzymes (e.g., CYPs, phase II-transferases), ii) catalytic activities of metabolizing enzymes, and iii) patterns of metabolites formed during incubation (metabolite profiling). In addition, the cytotoxicity and genotoxicity of reference compounds will be investigated in the particular skin model that offers best metabolic performance compared to human skin *ex vivo*. Within the first 18 months, the analytical methods will be established, the metabolic capacity of the models will be characterized, and standard protocols (SOP's) for the toxicological endpoints will be

established. Subsequently, the SOP's will be transferred to all partner laboratories and inter-laboratory reproducibility with the selected skin model will be assessed. It is anticipated to formally validate the established methods during a third year period, for which a separate application form will be submitted in due time.

**Corresponding Author**

PD Dr. Dr. Andreas Luch  
Bundesinstitut für Risikobewertung  
Thielallee 88 – 92  
14195 Berlin  
Tel: 030-8412-4538  
Email: [andreas.luch@bfr.bund.de](mailto:andreas.luch@bfr.bund.de)

**Projekt: „Der Zebrafischembryo als Ersatz des akuten Fischtests: Bestimmung der Biokonzentration, der wirksamen Dosis und der Wirkungsanalyse von lipophilen organischen Substanzen mittels chemisch-analytischer und Proteomanalyse -Eine Erweiterung des Zebrafischembryoassays**

**Förderkennzeichen: 0315399**

**Laufzeit: 01.03.2009 – 29.02.2012**

**Zusammenfassung**

Anthropogen in die Umwelt eingetragene Chemikalien stellen für Lebewesen eine Risiko dar, sobald sie in ausreichender Menge von den Organismen aufgenommen werden und die Gesundheit, das Überleben einer Art oder einer Population beeinträchtigen. Die Abschätzung der möglichen Aufnahmemenge in Fischen wird üblicherweise mit Hilfe des Biokonzentrationsfaktors (BCF) durchgeführt. Der Fischembryo-Bioassay mit den Embryonen des Zebraärlblings (*Danio rerio*) wird als eine viel versprechende Ersatzmethode zur Bestimmung von BCF-Werten für Substanzen angesehen. Hierbei könnte die Anreicherung von Substanzen in Fischembryonen bestimmt und mittels Korrelation für die zu erwartenden Effekte in Fischen extrapoliert werden, um anschließend Grenzwerte für Gewässer bzw. Nutzungsbeschränkungen für die jeweiligen Substanzen abzuleiten. Mit Hilfe der BCF-Bestimmung lassen sich ebenfalls Aussagen über Pharmakokinetik/-dynamik (PKPD) von organischen Substanzen in diesen Organismen treffen. Modellierungen der PKPD mittels Fischembryonen könnten ebenfalls zu einer Verringerung von Tierversuchen führen, wenn diese mit den Aufnahme/Abgaberraten von adulten Fischen korrelieren.

Neben der Bestimmung der Biokonzentration durch die Nutzung von Zebrafischembryonen anstelle von adulten Fischen, ist eine weitere Nutzung der Embryonen als Ersatzmethode für akute Fischtests in der Chemikalienbewertung auch und besonders im Rahmen von REACH vorstellbar. Die Bewertung der Toxizität von Substanzen wird derzeit überwiegend nach den OECD Richtlinien 203 und 204 durchgeführt. Allerdings existieren einige wesentliche Merkmale, die die unreflektierte und generelle Nutzung des Fischembryos als echte Ersatzmethode für den Fischtest (OECD 203 und 204) in der Chemikalienbewertung erschweren. Dabei lassen sich die wichtigsten Unterschiede zwischen Fischembryo und ausgewachsenem Fisch in folgende Punkte zusammenfassen: Metabolisierung von aufgenommenen Substanzen, Empfindlichkeitsunterschiede zwischen Fischembryo und Fisch sowie die Testdurchführung/ -dauer.

Zusätzlich sollen mit Proteomanalysen Biomarker identifiziert werden, die eine Aussage über eine akute/verlängerte Toxizität von Substanzen zulassen und damit als vorangestellte Entscheidungsgrundlage für die Art und Anzahl von durchzuführenden Fischtests dienen kann.

Die Ziele dieses Forschungsvorhabens liegen daher i) in der Erweiterung des Fischembryobioassays mit Embryonen des Zebraärlblings zur BCF-Wert Bestimmung von lipophilen organischen Substanzen, sowie ii) in der verbesserten Wirkungsanalyse und Toxizitätsbewertung mittels PKPD-Modellierung und iii) in der Identifikation von Biomarkern für die Entscheidung, ob und in welcher Form der akute bzw. verlängerter Fischtest nötig ist, sowie iiiii) in einem Verfahrensvorschlag für die Nutzung des Zebrafischembryos zur Risikobeurteilung von Chemikalien.

**Projektleitung: Dr. Eberhard Küster & PD Dr. Rolf Altenburger, Department Bioanalytische Ökotoxikologie, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig,**

**Tel.: ++49 (0)341- 235 1525, Fax: ++49 (0)341-235 2410, [eberhard.kuester@ufz.de](mailto:eberhard.kuester@ufz.de)**

## **„The zebra fish embryo as a replace for the acute fish test: Analysis of the bioconcentration, the effective dose and the mode of action of lipophilic organic substances by the use of chemical analytics and proteom analysis“ - an expansion of the zebra fish embryo assay“**

### **Summary:**

Anthropogenic chemicals in the environment pose a risk to organisms if they are taken up and effect the health and survival of the exposed organisms or populations. The evaluation of the amount of substance taken up in fish is usually done via the analysis of the bioconcentration factor (BCF). The assay with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*) is seen as a very good ersatz method to be used for the BCF-analysis. The bioconcentration of substances could be measured in fish embryos and be correlated to existing fish data sets for generating limit values or limitations for usage of the respective substances. With the use of BCF data also pharmacokinetic and -dynamic modelling can be accomplished to get a better insight into the rates of uptake/metabolism or release of fish embryos which then can be compared to known PKPD of adult fish.

Beside the analysis of the bioconcentration using zebrafish embryos, another usage of the embryos -not only but also- for the hazard assessment of chemicals under REACH is possible. The toxicity assessment of substances is usually done using the OECD guidelines 203/204. But a complete replacement of the fish test with the fish embryo assay is not feasible with the today knowledge as major differences between the fish embryo/larvae and the adult fish might exist. The most important differences are for example: uptake, metabolism and release of the substances, differences in sensitivity between embryos/larvae and fish and duration of the tests.

To identify biomarkers of effect in fish embryos or larvae, proteom analysis will be used in addition. This is seen to be of help in the decision about the need of -or the amount of- further acute/prolonged toxicity tests with adult fish. The biomarkers could help to define the concentration range of the test substance which exerts an effect in adult fish (range-finding). This way the biomarkers would decrease the amount of used fish in a range finding.

The objectives of this project are therefore i) the amendment or replacement of the BCF-analysis of lipophilic substances with fish by using fish embryos instead, ii) the improved analysis of the mode-of-action and toxicity assessment by using PKPD-modelling, iii) the identification of biomarkers for the decision if and how many fish tests still have to be done for regulatory purposes, iiiii) to write a proposal/guidance paper how to use the zebrafish embryo/larvae instead of adult fish for the risk assessment of chemicals.

**Verbundprojekt: Prävalidierungsstudie zur Prüfung der toxischen Wirkung von schwer löslichen, lungengängigen Stäuben mit dem Vektorenmodell, Teilprojekte 1 – 3**  
**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0315483A, B, C**  
**Laufzeit: 01.05.2009 bis 30.04.2011**

## **Zusammenfassung**

Für die Beurteilung des Gefährdungspotentials schwer löslicher, lungengängiger Partikel durch in vitro-Tests existiert derzeit keine geeignete OECD-Richtlinie. Im Zuge des REACH-Prozesses erscheint eine entsprechende Richtlinie jedoch dringend geboten. Das Forschungsvorhaben hat daher zum Ziel, eine seit Jahren erfolgreich angewandte in vitro-Prüfmethode (Vektorenmodell) der IBE R&D gGmbH zu prävalidieren, was im Sinne des 3R-Konzepts ist (Replacement, Reduction, Refinement). Um die Genauigkeit und die Diskriminationsfähigkeit des bestehenden Verfahrens zu erhöhen, sollen zusätzliche zellbiologische Endpunkte aufgenommen werden, die dem Stand der Wissenschaft entsprechen. In Zusammenarbeit mit zwei universitären Forschungseinrichtungen sollen u.a. bestimmte Signalmoleküle, die Lipidperoxidation sowie die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) auf ihre Eignung für ein erweitertes Vektorenmodell geprüft werden. Die bislang eingesetzten Alveolarmakrophagen aus Spendertieren sollen nach Möglichkeit durch ausgewählte Makrophagen-Zelllinien ersetzt werden, wobei der Anschluss an bisherige Ergebnisse durch zahlreiche Tests sichergestellt wird. In allen Teilen der Studie kommen Referenzmaterialien mit bekanntem Wirkungsspektrum zum Einsatz, die von industriellen Partnern langfristig erzeugt und qualitätskontrolliert bereit gestellt werden können. Am Ende der ersten Förderperiode soll ein erweitertes, prävalidiertes und GLP-kompatibles Vektorenmodell stehen, das Partikeleffekte in einem Multi-Dosis-Ansatz unter Berücksichtigung des „No Effect Levels“ zuverlässig in vitro abbildet.

Kontaktadresse:

Prof. Dr. Martin Wiemann  
IBE R&D gGmbH  
Elbestr. 10,  
45768 Marl,  
Phone ++49 2365 915390  
Fax ++49 2365 915399  
Email [martin.wiemann@ibe-marl.de](mailto:martin.wiemann@ibe-marl.de)

## **Pre-validation study to examine the toxic potential of poorly soluble, respirable particles by means of the Vector Model**

Presently, there is no suitable OECD guideline to determine *in vitro* the risk potential of poorly soluble, respirable particles. However, due to the demands of the REACH process, such a guideline is highly appreciable. Aim of this research program is to further develop and pre-validate an *in vitro* approach ("Vector Model") which has been successfully used by the IBE R&D gGmbH since many years. The research program is therefore fully in line with the 3R concept (Replacement, Reduction, Refinement). To enhance the specificity and discriminatory power of the present approach, additional cell biological endpoints being in accord with current knowledge of particle toxicity shall be incorporated into the present approach. In cooperation with two university research laboratories, e.g. several new signalling molecules, lipid peroxidation, or nitric oxide production shall be investigated for a meaningful contribution to the advanced Vector Model. Well established macrophage-like cell lines were designated to replace the currently used alveolar macrophages from donor animals wherever possible. This demands extensive testing to assure comparability of previous findings. Well characterized reference materials with known biological activity or toxicity will be long-term provided by industrial partners and used throughout. At the end of the first funding period there should be an advanced, pre-validated and GLP compatible Vector Model. Based on multi dose testing, the model should reliably predict biological effects as well as "No Effect Levels" of particles *in vitro*.

Please Contact

Prof. Dr. Martin Wiemann  
IBE R&D gGmbH  
Elbestr. 10,  
45768 Marl,  
Phone ++49 2365 915390  
Fax ++49 2365 915399  
Email [martin.wiemann@ibe-marl.de](mailto:martin.wiemann@ibe-marl.de)

Verbundprojekt:

**Bewertung von Irritation und Toxizität durch Chemikalien  
an der Hornhaut des Auges mit dem Ex Vivo Eye Irritation Test  
– Rating Eye exposure by an Advanced self-healing Culture Test  
(REACT), Teilprojekte 1 bis 3**

Aktenzeichen: 0315491A/B/C

Laufzeit: 01.06.2009 bis 31.05.2011

Zusammenfassung:

Der Ex Vivo Eye Irritation Test (EVEIT) ist eine neuartige in vitro - Testmethode, die die Untersuchung von chemischen, physischen und medizinischen Auswirkungen von Substanzen nach einfacher oder mehrfacher Exposition am Auge ermöglicht. Der EVEIT beruht auf der Langzeitkultur von Kaninchenhornhäuten aus der Nahrungsmittelerzeugung und ermöglicht im Vergleich zu anderen Tests mit isolierten Augen, wie dem Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) oder Isolated Rabbit Eye (IRE), eine langfristige morphologische und metabolische Stabilität des Testsystems von mehr als 21 Tagen. Dies erlaubt die Beobachtung von morphologischen und metabolischen Änderungen nach spezifischer Exposition sowie die Einschätzung der Heilung nach chemischem oder mechanischem Trauma. Im Gegensatz zu cornealen Konstrukten, die die Ähnlichkeit zur echten Hornhaut noch beweisen müssen, sind beim EVEIT alle Gegebenheiten der Hornhaut a priori originär vorhanden, wodurch sich eine dem Menschen sowie Tierversuchen biochemisch und morphologisch große Ähnlichkeit ergibt.

Ziel des beantragten Verbundprojektes ist die Weiterentwicklung des EVEIT zu einem Verfahren, mit dem die augenspezifische Gefährdung durch Chemikalien und Wirkung von Pharmaka universell und ohne Tierversuche dargestellt werden kann.

Dazu soll die Integration der Optischen Kohärenz-Tomographie (OCT) als innovatives, nicht-invasives, schnittbildgebendes diagnostisches Verfahren weiter vorangetrieben werden, um neben statisch invasiven Endpunkten dynamische Beobachtung durchführen zu können. Mit dieser in situ Verlaufskontrolle wird eine zeitlich gestaffelte Analyse des geschädigten Volumens und des Fortschritts der Heilung sowie die Erfassung von Verletzungen des Endothels oder der Stammzellbereiche ermöglicht. Diese Parameter sollen für ein Bewertungsschema und ein Prädiktionsmodell genutzt werden, dass auf Basis von Referenzsubstanzen erarbeitet wird.

Die multilokale Exposition im EVEIT, die innerhalb des Projektes weiterentwickelt werden soll, erlaubt es, die akute sowie die chronische Toxizität von verschiedenen Substanzen oder deren Konzentrationsabhängigkeit auf einer einzelnen Hornhaut zu untersuchen und ermöglicht dadurch eine intra-individuelle Referenzierung. Zusätzlich eröffnet die multilokale Anwendung einen hohen Durchsatz von Untersuchungen mit statistischer Relevanz zu einem gemäßigten Kostensatz.

Mit der Vereinfachung der Inkulturnahme der Hornhäute bis hin zur Entwicklung standardisierter Prozesse, deren Eignung in einem Interlaborvergleich nachgewiesen wird, soll auf Basis der Kombination aus multilokalem EVEIT und OCT ein Verfahren etabliert werden, das eine innovative und universelle Plattform für alternative tierversuchsfreie Forschung im Sinne der 3R-Prinzips von Russell & Burch im Rahmen von REACH und der EU Direktive zur Bewertung von Kosmetika und Pharmaka bildet.

Projektkoordination:

ACTO e. V.  
Prof. Dr. med. Norbert Schrage  
Karlsburgweg 9  
52070 Aachen  
Tel.: 0241/9974-180  
Fax: 0241/9974-181  
E-Mail: [schrage@acto.de](mailto:schrage@acto.de)

**Evaluation of chemical toxicity and irritations on the eye  
using the Ex Vivo Eye Irritation Test  
– Rating Eye exposure by an Advanced self-healing Culture Test  
(REACT)**

Summary:

The Ex Vivo Eye Irritation Test (EVEIT) is a novel in vitro test method which enables the investigation of chemical, physical and medical toxicity in single and repeated exposures at the eye. It is based on living rabbit corneas from animals slaughtered for food production which are cultured for long term. In contrast to tests like the Bovine Cornea Opacity and Permeability test (BCOP) or Isolated Rabbit Eye test (IRE) with the EVEIT an observation period of the metabolic stability over more than 21 days is possible. This enables the observation of biochemical and morphological changes after specific chemical exposures including the evaluation of recovery after chemical or mechanical trauma. In contrast to the cell and tissue culture of corneal tissue engineered constructs which need to give proof of the similarity to the real cornea, the EVEIT system a priori contains the metabolic, functional and anatomic features of the living organ. Thus this alternative test is closely comparable to animal experiments and human cornea. The intention of the proposed collaborative project is to establish a test method that is universally applicable for evaluation of eye-specific exposure by chemicals and pharmaceuticals without the need for animal tests.

Therefore optical coherence tomography (OCT) as an innovative, non-invasive, cross-sectional imaging modality will be integrated within the test procedure. This will enhance the process monitoring from static invasive endpoint analysis to also critical in time dynamic observations. This step will enable *in situ* monitoring of the area and depth of damages, the progress of healing as well as the amount of endothelium or stem cell damage over time.

A multi-local exposure modality within the EVEIT will also be further developed within the project. This allows for the investigation of acute as well as chronic toxicities of different substances or concentrations on a single cornea using intra-individual referencing as a systematic advantage in reliability. Additionally the multi-local exposure setup enables high throughput testing with statistical relevance at moderate costs.

Beginning with improvements in the culturing technique up to the development of standardized processes, the combination of the multi-local EVEIT and OCT will be analysed within an inter-laboratory test. Thereby it is intended to establish an innovative and universal platform that allows for research without animal experiments in terms of the 3R principle of Russell & Burch. Special focus is on the applicability of the test platform within the REACH regulations or the EU directive for the evaluation of cosmetics or pharmaceutical products.

Project Coordination:

ACTO e. V.  
Prof. Dr. med. Norbert Schrage  
Karlsburgweg 9  
52070 Aachen  
Germany  
Tel.: 0241/9974-180  
Fax: 0241/9974-181  
E-Mail: [schrage@acto.de](mailto:schrage@acto.de)

---

**Verbundprojekt: Entwicklung prädiktiver *in vitro* Tests zur sicherheitstoxikologischen Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität - Phase II, Teilprojekte 1 bis 5**  
**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0315522 A, B, C, D, E**  
**Laufzeit: 01.07.2009 bis 31.08.2011**

Untersuchungen zur Entwicklungsneurotoxizität von chemischen Stoffen werden nach Prüfrichtlinien der U.S. EPA (Test Guideline 870.6300) und dem Entwurf der OECD (Richtlinie 426) durchgeführt. Diese Richtlinien umfassen die Untersuchung der Morphologie des Gehirns der Versuchstiere (in der Regel Ratten), eine Reihe von neuroklinischen Verhaltens- und Reaktionstests, die Beurteilung der Entwicklung der Jungtiere, und schließen bei indizierten Fällen die Untersuchung spezifischer Biomarker ein. Für diese Tests zur Entwicklungsneurotoxizität ist eine sehr große Zahl an Versuchstieren erforderlich, etwa 140 Muttertiere und 1000 Jungtiere. Sie erstrecken sich über etwa drei Monate. Die Untersuchung der oben beschriebenen Parameter erfordert einen großen technischen und logistischen Aufwand und besonders geschultes Personal. Aus diesen Gründen sind *in vivo* Tests zur Entwicklungsneurotoxizität extrem arbeitsaufwändig, komplex und kostenintensiv.

Im Laufe der letzten Jahre hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass einige Stoffe eine besondere Gefahr für Kinder darstellen, und die besondere Empfindlichkeit des sich entwickelnden menschlichen Gehirns rückte immer mehr in den Mittelpunkt der Aufmerksamkeit. Inzwischen wird für chemische Substanzen mit bekannten neurotoxischen oder teratogenen (insbesondere neuroteratogenen) Effekten ebenfalls eine Untersuchung zur Entwicklungsneurotoxizität empfohlen. Darüber hinaus fordert die U.S. EPA die Untersuchung der Entwicklungsneurotoxizität von Pestiziden. Im REACH Programm der Europäischen Union, bei dem ca. 30.000 Substanzen hinsichtlich ihres toxischen Potentials bewertet werden müssen, werden Tests zur entwicklungsbedingten Neurotoxizität empfohlen, wenn sich Hinweise darauf aus anderen *in vivo* Studien ergeben haben (ECHA, Mai 2008).

Es ist heute schon abzusehen, dass diese Situation zu einem enormen Anstieg der Versuchstierzahlen im Bereich der Entwicklungsneurotoxizität führen wird. Validierte tierversuchsfreie Alternativmethoden zur Reduzierung des hohen Tierverbrauches stehen derzeit nicht zur Verfügung. Aus den oben genannten Gründen besteht ein dringender Bedarf an der Entwicklung standardisierter und zeitsparender *Screening-Tests* zur Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität, die auf Zellkulturverfahren basieren und als Alternative zum stark belastenden Tierversuch eingesetzt werden können.

Die Zielsetzung des geplanten Fortsetzungsprojektes ist gegenüber der ersten Antragsperiode unverändert. Gesamtziel des Projektes ist nach wie vor die Entwicklung einer neuen modularen Teststrategie zur sicherheitstoxikologischen Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität. Dabei sollen weiterhin verschiedene zellbasierte Modelle eingesetzt werden, die komplementär zueinander Teilaspekte der neuronalen Entwicklung *in vitro* erfassen und damit in ihrer Gesamtheit einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Entwicklung eines modularen *in vitro* Testsystems für Entwicklungsneurotoxizität bilden. Folgende Zellkultursysteme sollen dabei eingesetzt werden:

- (1) murine und humane embryonale Stammzellen (Dr. A. Seiler, PD Dr. Dr. A. Luch; BfR, Berlin und Prof. Dr. A. Schrattenholz, Dr. M. Klemm-Manns; ProteoSys AG, Mainz),
- (2) humane fetale neurale Progenitorzellen (Prof. Dr. E. Fritsche, Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF) an der Heinrich-Heine-Universität gGmbH, Düsseldorf),
- (3) humane Teratocarcinoma Zellen (Prof. Dr. G. Bicker; Physiologisches Institut, Abt. Zellbiologie; Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) und
- (4) verschiedene Zellkultursysteme auf Neuronensensorchips (Prof. Dr. U. Egert, Institut für Mikrosystemtechnik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg).

Für die verschiedenen Zellsysteme wurden in der letzten Förderperiode biochemische und funktionelle Assays zur Testung auf Entwicklungsneurotoxizität etabliert. Des Weiteren wurde in einem ersten 'Proof-of-concept' gezeigt, dass die Testsysteme in der Lage sind,

Entwicklungsneurotoxizität zu erkennen. Es zeigte sich aber auch, dass die Detektion eines entwicklungsneurotoxischen Potentials *in vitro* einer Zeitkinetik unterliegt und damit vom jeweilig angewendeten Belastungsschema abhängt. In der kommenden Antragsphase sollen nun die Protokolle hinsichtlich der Zeitkinetik sowie der Substanzauswahl optimiert werden, um die spezifischsten und prädiktivsten Endpunkte in den einzelnen Modellen zu etablieren. Diese Versuche werden am Ende der Förderperiode dazu führen, dass ausgewählte Assays für die Prävalidierung als Tierversuchersatzmethoden zur Testung von Chemikalien auf Entwicklungsneurotoxizität bereitgestellt werden können.

Um von Anfang an eine spätere Anwendbarkeit in praxi und die wissenschaftliche Akzeptanz sicherzustellen, wird die BASF (vertreten durch Herrn Dr. W. Kaufmann) von Seiten der Chemischen Industrie und potentieller Anwender die Entwicklung des *in vitro* Testsystems wissenschaftlich begleiten.

## Summary:

### Development of Predictive *In Vitro* Tests for Developmental Neurotoxicity Testing — Phase II

Given the significant potential of chemicals and drugs to interfere with the development of the nervous system, regulatory test guidelines have been adopted for the prediction and assessment of developmental neurotoxicity (U.S.EPA OPPTS 870.6300 and OECD TG 426). However, current *in vivo* test methods are laborious, costly and necessitate the use of high numbers of laboratory animals. Around 1000 pups have to be handled in an *in vivo* DNT study and at least 140-mated dams are used to produce enough pups from different litters available to the test. Moreover, the study design is complex and clear and straight-forward recommendations for optimal methodological approaches in DNT studies are not available to date. In addition, under the REACH program of the European Commission it is planned to evaluate approximately 30,000 existing chemicals for their toxicological properties. Prediction of developmental neurotoxic effects is a key feature in the toxicological profile of a compound and triggered DNT studies are recommended under REACH (ECHA, May, 2008). This situation certainly will dramatically increase the number of laboratory animals used for toxicity testing. Conversely, validated alternative methods for developmental neurotoxicity testing are still not available to date. Thus, standardized, predictive screens for the evaluation of developmental neurotoxicity soon need to be made available with the ultimate goal of increased efficiency in terms of reduced animal use and higher throughput compared to whole-animal testing using existing guidelines.

The overall goal of this grant renewal is to develop standardized predictive cell-based *in vitro* assays for developmental neurotoxicity testing. In the frame of the already approved and accomplished <sup>1st</sup> phase of our research project, different complementary cell models representing selected developmental stages of the developing brain *in vivo* have been investigated to predict developmental neurotoxicity *in vivo* from *in vitro* data. These cell models are

(1) murine and human stem cells, (Dr. A. Seiler, PD Dr. Dr. Andreas Luch; BfR, Berlin und Prof. Dr. A. Schrattenholz, Dr. M. Klemm-Manns; ProteoSys AG, Mainz),

(2) human neural progenitor cells (Prof. Dr. E. Fritsche; Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF) an der Heinrich-Heine-Universität gGmbH, Düsseldorf),

(3) human teratocarcinoma cells (Prof. Dr. G. Bicker; Physiologisches Institut, Abt. Zellbiologie; Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) and

(4) neuro-sensorchips. (Prof. Dr. U. Egert, Institut für Mikrosystemtechnik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg).

To assess developmental neurotoxicity, molecular and mechanistic endpoints like *differentiation*, *migration*, *proliferation* have been successfully established in the frame of the first grant application. Furthermore, the different models seemed applicable to detect a diverse group of positive and negative developmental neurotoxicants. However, it also turned out that the detection of specific neu

developmental effects depends on the exposure regimes used. Different exposure regimes along with the selected set of positive and negative developmental neurotoxicants therefore need now to be evaluated in order to establish the most specific and predictive endpoints for DNT testing in the models applied. This was not the primary goal of the first grant application which itself focused on the *proof of principle*.

To guarantee an applied and user friendly development of the test systems, a representative from the chemical industry (Dr. W. Kaufmann, BASF, Ludwigshafen, Germany) will serve as an external consultant of the joint project.

Kontaktinformation der Projektkoordination:

Dr. Andrea Seiler

PD Dr. Dr. Andreas Luch

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)  
ZEBET

Federal Institute for Risk Assessment (BfR)  
Center for Alternative Methods to Animal Experiments - ZEBET  
Diedersdorfer Weg 1,  
D-12277 Berlin, Germany

Tel.: +49-(0) 30-8412-2278 /4538

Fax: +49-(0) 30-8412-2958

E-Mail: [Andrea.Seilerebfr.bund.de](mailto:Andrea.Seilerebfr.bund.de) E-

Mail: [Andreas.Luch@bfr.bund.de](mailto:Andreas.Luch@bfr.bund.de)

**Verbundprojekt: Validierungsstudie zur Prüfung auf Hautpenetration mit Hilfe von biotechnologisch hergestellten Hautmodellen - (Phase 1), Teilprojekte 1 – 6**  
**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0315498A und B**  
**Laufzeit: 01.08.2009 bis 31.07.2012**

**Zusammenfassung:**

**Organotypische Schnittkulturen humaner Tonsillen: Etablierung eines dem Tierversuch überlegenen Modellsystems für die Zulassungsprüfung von Pharmaka und die immunologische Grundlagenforschung**

Untersuchungen in Schnittkulturen bieten im Gegensatz zu Tierexperimenten zwei entscheidende Vorteile: Die Offenheit des Systems erlaubt die direkte Beobachtung durch Lebendmikroskopie (Live-Imaging) sowie die gezielte Applikation von Pharmaka, deren Effekte auf bestimmte Zellpopulationen live und mit hoher Auflösung sichtbar gemacht werden können. Zudem können Zellgruppen während des Experimentes isoliert und z.B. genetisch analysiert werden, um Pharmawirkungen zu charakterisieren. Ziel dieses Projektes ist es, mit humanen Tonsillenkulturen ein Prüfsystem für neue „Biologicals“ schaffen, das geeignet ist, den prädiktiven Wert präklinischer Studien an Affen zu bestimmen und gegebenenfalls den Umfang an Affenexperimenten massiv zu reduzieren. Dieses System, das wir hier mit TGN1412 validieren wollen, wird auch geeignet sein, Speziesunterschiede im Allgemeinen zu untersuchen und immunologische Grundlagenforschung ohne Tierexperimente auf höchstem Niveau in einem humanen System zu betreiben. Nach der „London Tragedy“, bei der in Mäusen, Ratten und Affen gut vertragene Antikörper TGN1214 bei sechs Probanden toxische Schocksyndrome ausgelöst haben, ist die Zeit reif, Speziesunterschiede als klinisch hochrelevant zu betrachten und Modelle zu entwickeln, die anwendungsbezogene Forschung und Grundlagenforschung in humanen Systemen erlauben.

**Kontaktdaten:**

Prof. Dr. med. Ingo Bechmann (Koordinator) Universität Leipzig - Medizinische Fakultät - Institut für Anatomie  
Liebigstr. 13  
04103 Leipzig

Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Kalinke  
Director and Division Head  
TWINCORE,  
Centre for Experimental and Clinical Infection  
Research  
Feodor-Lynen-Str. 7  
30625 Hannover

## Summary:

### **Human tonsil-derived slice cultures: A model system for testing novel drugs and basic science in immunology**

#### **Participants:**

Prof. Dr. med. Ingo Bechmann  
(Koordinator) Universität Leipzig  
- Medizinische Fakultät - Institut  
für Anatomie  
Liebigstr. 13  
04103 Leipzig

Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Kalinke  
Professor für Experimentelle  
Infektionsforschung Geschäftsführer  
und Direktor  
TWINCORE, Zentrum für  
Experimentelle und Klinische  
Infektionsforschung GmbH  
Feodor Lynen-Str. 7  
30625 Hannover

Gastwissenschaftler, Abteilung  
Immunologie Paul-Ehrlich-Institut  
Paul-Ehrlich-Straße 51-59  
63225 Langen

The „London Tragedy” in which a novel drug (TGN1214) caused toxic shock in six volunteers emphasizes the existence of highly relevant species differences: the drug had been well tolerated by monkeys. Since then, several committees of experts stated the need for safe test systems using human tissues. One such system is the organotypic slice culture, which has several advantages over animal experiments. It allows open access for adding drugs and observing their effects using live-imaging with two-photon microscopy over long time periods and at extremely high resolution. Moreover, distinct cellular populations can be isolated for genetic analysis. Strikingly, slice cultures can be prepared from human tissues offering a unique test system for a variety of applications.

We have established slice cultures of human lymph nodes and tonsils, which now can serve to identifying immunological effects of novel biological drugs such as monoclonal antibodies (mAbs). Currently new mAbs are tested in rodents and monkeys. Usually, at least 80 animals are included in studies per new mAb with currently approximately 350 drugs under testing in the EU. Using TGN1412 and as a control reagent anti-CD3 antibodies that is used in the clinics, we want to generate a test System allowing for detection of toxic effects such as cytokine storm before the respective drug is tested in animals or humans. Besides live-imaging, drug effects can be studied at the transcriptional levels. This System may also serve basic scientists to study many aspects of immunology in a human system rather than in animal experiments. Certain antibody families such as immunoregulators act in a species-specific manner as immunological master switches. Rendering animal experiments is in principle questionable for the prediction of their effects in humans.

**Verbundprojekt: Go3R - Entwicklung und Etablierung einer semantischen Suchmaschine für Alternativmethoden zu Tierversuchen (Teilprojekte 1 - 4)**  
**Laufzeit: 01.06.2009 bis 31.05.2012**

**Zusammenfassung**

2006 wurden in Deutschland allein über 2,5 Millionen Tiere zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet. Diese Zahl wird in den nächsten Jahren weiter wachsen, da beispielsweise allein durch die neue EU Chemikalienverordnung (REACH) die Anzahl der für die Chemikalienprüfung genutzten Versuchstiere Schätzungen zufolge pro Jahr von 200 000 auf bis zu 600 000 wachsen wird (1). Daraus ergeben sich allein für die durch REACH betroffene Industrie Mehrkosten von bis zu 5.4 Milliarden Euro (2).

Darüber hinaus zeichnet sich auf Ebene der EU bei der Novellierung der Richtlinie 86/609/EWG ab, dass der Prüfung der ethischen Unerlässlichkeit und dem Genehmigungsverfahren für Tierversuchsvorhaben mehr Beachtung als bisher eingeräumt werden soll, um alle Möglichkeiten im Sinne des 3R-Konzeptes von Russell & Burch (1959) zum Ersatz, zur Reduktion und zur Leidensminderung von Tierversuchen auszuschöpfen. Die Reduktion von Verbrauchszahlen ist damit moralisch, ökonomisch und auch gesetzlich (3, 4) zwingend notwendig. Kern einer jeden Strategie zur Reduktion von Tierexperimenten ist die Verfügbarkeit der relevanten Informationen zu Alternativen. Dabei ergeben sich folgende **Probleme**:

- P1. Die Informationen sind verstreut über Internet, Patentdatenbanken, Literaturdatenbanken, Intranet.
- P2. Die Informationen sind verteilt auf über 50 Millionen potentiell relevante Dokumente. Die Zahl wächst exponentiell weiter. Dokumentübergreifende Zusammenhänge sind nur schwer zu betrachten.
- P3. Die Fülle an vorhandenen Informationen und die Breite des Fachgebietes erschweren die Informationssuche zu alternativen Methoden.
- P4. Klassische Suchtechnologien sind nicht in der Lage, Alternativen, nach denen ein Nutzer nicht direkt gesucht hat, aufzuzeigen.
- P5. Zum Teil ist Forschern in einem bestimmten Fachgebiete nicht bewusst, welche Bedeutung ihre Forschungsergebnisse für die Entwicklung von Alternativmethoden in anderen Gebieten haben könnten.

Ziel des Go3R Projektes ist die Entwicklung und Etablierung einer semantischen Suchmaschine für Alternativmethoden, die es ermöglicht, die Unerlässlichkeit von Tierversuchen schnell, umfassend und transparent nachvollziehbar zu bewerten, Trends zu erkennen, sowie Fachgebiete so zu vernetzen, dass Arbeiten mit Bezug zum 3R-Prinzip in allen Bereichen verfügbar sind. Dabei ergeben sich folgende Ziele:

**Teilziele, Beitrag zu Schwerpunkten des Förderprogramms, Arbeitsziele:**

- Z1. Die quantifizierbare Reduktion von Tierversuchszahlen insbesondere bei sinnesphysiologisch hochentwickelten Arten durch Bereitstellung von in der Literatur dokumentierten Alternativen.
- Z2. Der integrierte Zugriff auf relevante Dokumente im Internet, Literaturdatenbanken, Patenten und Intranetzen. Tagesaktuelle Bereitstellung der Dokumente.
- Z3. Systematische Verzahnung von Tierexperimenten und Alternativen, die es ermöglicht, Nutzer unmittelbar auf Alternativen aufmerksam zu machen.
- Z4. Aufbau einer weltweit vernetzten Gemeinschaft aller Wissenschaftler, die zu Alternativen beitragen oder sie nutzen können, und Etablierung von Deutschland als international führende Kraft im Bereich 3R.

Damit wird Go3R einen Beitrag leisten

- zur Prüfung der Unerlässlichkeit und Nichtersetzbarkeit von Tierversuchsvorhaben,
- zur Entwicklung, Validierung, Akzeptanz und Anwendung von Alternativmethoden zu Tierversuchen,
- zur Ermittlung des Standes der wissenschaftlichen Erkenntnis zu einer speziellen

Fragestellung,

- zur Information über aktuelle Entwicklungen und neue Fragestellungen in der Grundlagen- und angewandten Forschung.

Zur Erreichung dieser Ziele bearbeiten die Partner ein Anwendungsarbeitspaket und vier Technologiearbeitspakete. Das Anwendungsarbeitspaket befasst sich mit toxikologischen Untersuchungen in der Industrie. Die vier Technologiearbeitspakete widmen sich den Dokumentquellen, der Bereitstellung und Verbreitung der Informationen, der Erstellung des Hintergrundwissens für die Suchmaschine und der Entwicklung der notwendigen neuartigen Suchalgorithmen, die Tierexperiment und Alternative mit Hilfe des Hintergrundwissens verzahnen.

Die Erfolgsaussichten des Projektes sind groß, da Transinsights semantische Technologien weltweit führend sind, wie im internationalen BioCreative-Wettbewerb gezeigt, da die Technologie mit der GoPubMed-Suchmaschine bereits etabliert ist und da BfR, Transinsight und TU Dresden bereits eine positive Machbarkeitsstudie durchgeführt haben.

### Quellen:

- (1) Höfer, T., Gerner, T., Gundert-Remy, U., Liebsch, M., Schulte, A., Spielmann, H., Vogel, R., Wettig, K. (2004). Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. Arch Toxicol 78: 549 – 564.
- (2) Antrag der Abg. Beate Fauser u. a. FDP/DVP und Stellungnahme des Umweltministeriums zur REACH Chemikalienverordnung, Landtag von Baden-Württemberg Drucksache 14 / 1166 14. Wahlperiode, 19. 04. 2007
- (3) Die Richtlinie des Rates zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedsstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (86/609/EWG)
- (4) Tierschutzgesetz vom 18.5.2006. BGBl. 1 S. 1206, ber. S 1313

### Kontakt Daten des Projektkoordinators:

Prof. Dr. Michael Schroeder

Professur für Bioinformatik  
Technische Universität Dresden  
Biotechnologisches Zentrum (BIOTEC)  
Tatzberg 47-51  
01307 Dresden

### Abstract:

In 2006, over 2.5 Million vertebrate animals were used in animal experiments in Germany. These numbers will further increase within the next years. Along the new EU Chemicals Regulation REACH is expected to lead to an EU-wide increase in the numbers of animals used for testing of chemicals from 200,000 up to 600,000 animals per year (1), which would result in a financial burden of up to 5.4 Billion Euro (2).

In addition EU Directive 86/609/EEC for the protection of laboratory animals obliges scientists to consider whether any planned animal experiment can be substituted by other scientifically satisfactory methods not entailing the use of animals or entailing less animals or less animal suffering, before performing the experiment. Likewise, it must be ensured that the information sought for is not available yet. To meet these regulatory obligations, scientists must consult the relevant scientific literature prior to any experimental study using laboratory animals. Therefore the replacement of animal

experiments and the reduction of the numbers of laboratory animals used is a mandatory obligation, both morally and economically, and also legally (3, 4). Thus, the core of any scientific strategy or political incentive to reduce and replace animal experiments lies in the availability of relevant information regarding alternative methods. Thus the following problems arise:

- P1. The information is spread over the web sites, patent databases, literature databases and intranets
- P2. The information is distributed throughout over 50 million potentially relevant documents. Their number is growing exponentially. Facts spread over several documents are hard to consider.
- P3. The amount of available information and the diversity of the research field complicate the search for information on alternative methods.
- P4. Classical search technologies fail, since they are unable to reveal alternatives that the user has not explicitly searched for. The procedure of application for the authorisation of an animal experiment is complex and not transparent.
- P5. Scientist in a specific research area are often not aware of the impact of their work on the development of alternative methods in other areas.

It is the goal of the Go3R project to develop and establish a semantic search engine for alternative methods, which enables all those involved in the planning, authorisation and performance of animal experiments to determine the indispensability of a given animal experiment in a fast, comprehensive and transparent manner. Go3R has also the goal to discover trends, as well as interconnecting research areas with significance to the 3Rs principle. This leads to the following detailed goals:

- Z1. The quantifiable reduction of the numbers of animals used in scientific procedures
- Z2. An integrated access will be developed to allow retrieving relevant documents from all relevant sources in the Internet, in literature and patent databases and in intranet.
- Z3. A systematic linkage of animal experiments and alternatives on the level of the information will make it possible to directly alert users to specific alternatives.
- Z4. The building-up of a globally networked community of all scientists making a contribution to the 3Rs or being able to apply alternative methods will strengthen Germany's international position in the area of the 3Rs.

Thus Go3R contributes

- to the assessment of the indispensability of animal experiments and clarification on the availability of replacement methods,
- to the development, validation, acceptance and application of alternative methods to animal experiments,
- to conceive the state of the art regarding a specific scientific question,
- to the information on current developments and novel research questions regarding foundational research and applied science.

The concept of the Go3R project is designed in one executive work packages and four technical work packages. The executive work packages covers the practical use scenarios of information searches in the course of applications for the authorization of animal experiments, during toxicological product safety testing in an industrial environment. During the technical work packages, the technology for the semantic indexing of Millions of documents will be developed.

The prospects of success of the project are high, since Transinsight's semantic technologies are globally leading as shown in the international BioCreative competition,

the technology as such has already been established within the search engine GoPubMed, and since the partners BfR, Transinsight GmbH, and TU Dresden have already successfully completed a feasibility study.

### References:

- (1) Höfer, T., Gerner, I., Gundert-Remy, U., Liebsch, M., Schulte, A., Spielmann, H., Vogel, R., Wettig, K. (2004). Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. *Arch Toxicol* 78: 549 – 564.
- (2) Parliamentary Petition of MP Beate Fauser and others and statement thereupon by the Minister for the Environment regarding the REACH Regulation. Parliament of the Federal State of Baden-Wuerttemberg. - Antrag der Abg. Beate Fauser u. a. FDP/DVP und Stellungnahme des Umweltministeriums zur REACH Chemikalienverordnung, Landtag von Baden-Württemberg Drucksache 14 / 1166 14. Wahlperiode, 19. 04. 2007.
- (3) Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal L* 358, 1. 28 December 1986.
- (4) German Animal Welfare Act. *Tierschutzgesetz* publ. 18.5.2006. *BGBI.* 1 S. 1206, ber. S 1313

**Contact details of the project coordinator:** Prof. Dr. Michael Schroeder

Professur für Bioinformatik  
Technische Universität Dresden  
Biotechnologisches Zentrum (BIOTEC) Tatzberg 47-51  
01307 Dresden

## **Verbundprojekt „Prävalidierung eines biotechnologisch hergestellten Hornhautmodells für die pharmakokinetische und sicherheitstoxikologische Prüfung. Phase II“**

**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0315504A-F**

**Laufzeit: 01.07.2009 bis 30.09.2010.**

### **Zusammenfassung**

Die Arbeiten, die in der ersten Phase des Vorhabens (Förderkennzeichen 0313913 A-D) zur Entwicklung einer Methode zum vollständigen Ersatz des Draize Augen-Irritationstests durchgeführt wurden, mündeten in der Konstruktion einer Hemi-Kornea aus immortalisierten, humanen Zelllinien unter serumfreien Bedingungen. Für die Anwendung dieser biotechnologisch hergestellten Korneamodelle zur sicherheitstoxikologischen und pharmakokinetischen Klassifizierung von Chemikalien wurden Endpunkte definiert und entsprechende Protokolle erstellt.

Ziele der 2. Projektphase sind der Methodentransfer und der Nachweis der Reproduzierbarkeit in der Herstellung der entwickelten Korneamodelle entsprechend den Standardprotokollen und Akzeptanzkriterien. Ein weiteres Ziel der zweiten Teilphase ist die Bewertung der Zuverlässigkeit und Relevanz der entwickelten Testmethoden in unabhängigen Laboren. Die von uns entwickelte Testmethode soll einen konkreten Beitrag zur Schließung der vorhandenen Lücke in der sequentiellen tierversuchsfreien Teststrategie zur Bewertung des augenreizenden Potentials von Substanzen liefern. Unsere Testmethode positionieren wir in der Teststrategie (Annex OECD TG 405) im Anschluss an die Ex-vivo-Verfahren für die Vorhersage von Augenirritation. Darüber hinaus soll das entwickelte Korneakonstrukt die zahlreichen Tierversuche in präklinischen, pharmakokinetischen Untersuchungen zur transkornealen Absorption von Ophthalmika ersetzen, die im Zuge behördlicher Verfahren sowie an Forschungseinrichtungen durchgeführt werden.

Verbundkoordinatorin:

Dr. Brigitte Rusche

Akademie für Tierschutz – Deutscher Tierschutzbund e.V.

Spechtstr. 1

85579 Neubiberg

Ansprechpartnerin

Dr. Maria Engelke

Universität Bremen, FB2

Leobener Str. 2

28359 Bremen

[m.engelke@uni-bremen.de](mailto:m.engelke@uni-bremen.de)

Projektpartner

Deutscher Tierschutzbund e.V. - Akademie für Tierschutz, Neubiberg

Technische Universität Braunschweig, Institut für Pharmazeutische Technologie,

Braunschweig

Universität Bremen, Institut für organische Chemie und Biochemie, Bremen

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Klinik für Dermatologie und Venerologie,

Hamburg

Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf

Across Barriers GmbH, Saarbrücken

### **Summary**

The work of the first phase of project for the development of a replacement alternative to the Draize eye irritation test (BMBF-FKZ 0313913A-D – Phase 1) resulted in the construction of a hemi-cornea model based on immortalised, human cell lines under serum-free culture conditions. Adequate endpoints for the application of this bioengineered cornea model for the classification of eye irritant chemicals and for permeation studies have been defined and corresponding standard protocols have been developed.

The aims of the second phase are the method transfer for the hemi-cornea construction and the evidence of its reproducibility according to standard operation procedures and acceptance criteria. Another aim is the assessment of the reliability and relevance of the test methods in different laboratories.

The test systems developed by the applicants will contribute to close a gap within proposed test strategies for the safety assessment of cosmetics and industrial chemicals. We aim at positioning our test method subsequently to the ex vivo tests within the sequential testing strategy (Annex OECD TG 405) for the prediction eye irritation. In addition, the bioengineered cornea construct should replace the numerous animal experiments which are obligatory in preclinical trials and are used within pharmacokinetic studies for the determination of the trans-corneal absorption/permeation behaviour of ophthalmic drugs.

Project co-ordinator

Dr. Brigitte Rusche

Akademie für Tierschutz – Deutscher Tierschutzbund e.V.

Spechtstr. 1

85579 Neubiberg

Scientific correspondence

Dr. Maria Engelke

Universität Bremen, FB2

Leobener Str. 2

28359 Bremen

m.engelke@uni-bremen.de

Project partners

Deutscher Tierschutzbund e.V. - Akademie für Tierschutz, Neubiberg

Technische Universität Braunschweig, Institut für Pharmazeutische Technologie,  
Braunschweig

Universität Bremen, Institut für organische Chemie und Biochemie, Bremen

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Klinik für Dermatologie und Venerologie,  
Hamburg

Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf

Across Barriers GmbH, Saarbrücken

**Projekt: Ersatz des Tierbedarfs beim Nachweis von Endotoxinen**

**Förderkennzeichen:0315709**

**Laufzeit: 01.06.2010 bis 31.05.2013**

**Kontaktadresse:**

Dr. Thomas Montag-Lessing  
Fachgebiet 1/3 Bakteriologische Sicherheit  
Paul-Ehrlich-Institut  
Paul-Ehrlich-Strasse 51-59  
D-63225 Langen

Tel.: +49(0)6103 77 8020  
E-Mail: month@pei.de

**Zusammenfassung:**

Der Tierversuch Kaninchen-Pyrogentest wurde bereits durch In vitro-Tests ersetzt; die Monographie "Monocyte Activation Test" (MAT) wurde durch Beschluss der Europäischen Arzneibuch-Kommission im März 2009 in Kraft gesetzt. Arzneimittel und deren Ausgangsstoffe werden jedoch weiterhin mittels *Limulus polyphemus*-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) auf Verunreinigungen durch Endotoxine untersucht. Um das Ausgangsmaterial für LAL-Tests zu gewinnen, muss in Freiheit lebenden Pfeilschwanzkrebse Hämolymph entnommen werden. LAL-Tests werden auch in Deutschland von Industrie und Behörden in enormem Umfang eingesetzt. Zwar ist die Bestimmung von Endotoxinen im MAT problemlos möglich, jedoch kann der LAL-Test nicht durch MAT in den aktuellen Varianten ersetzt werden, weil deren Sensitivität nicht ausreicht und die Testdurchführung zu viel Zeit erfordert. Auf der Basis von im PEI entwickelten Technologien sollen neuartige Methoden erarbeitet werden, welche sowohl die Sensitivität der heutigen LAL-Tests erreichen (100 fg/ml) als auch innerhalb weniger Stunden durchführbar sind, um eine praxisnahe Alternative zum LAL-Test zu schaffen. Die erforderliche Sensitivität soll über eine Anreicherungstechnik für Endotoxin mittels Beads, welche mit LPS-affinen Liganden beladen sind, erreicht werden; das Funktionsprinzip wurde in Vorversuchen im PEI erfolgreich erprobt. Die Liganden (z.B. humanes LPS Binding Protein, humanes CD14) sollen kloniert und gentechnisch hergestellt werden. Die Beschleunigung der Tests soll mittels verschiedener Methoden (z.B. Nachweis der mRNA der Zytokine IL-1 beta, IL-6 und TNF-alpha mittels Real Time RT-PCR, Nachweis der genannten Zytokine in der Zytofluorometrie) erreicht werden.

**Abstract:**

Recently, the Rabbit Pyrogen Test has been officially replaced by *in vitro* assays; the monograph "Monocyte Activation Test" (MAT) has been implemented via decision by the European Pharmacopoeia Commission in March 2009. However, medicinal products and their starting materials are still being tested for endotoxin impurities using the *Limulus polyphemus* Amebocyte Lysate Test (*LAL test*). To collect *the* starting material, haemolymph has to be drawn from wild living horseshoe crabs. LAL tests are also used by industry and authorities in Germany to a significant extent. Although the determination of endotoxins in the MAT test can be performed without any problems, the MAT test in its current variations cannot replace the LAL tests, since the sensitivity of MAT tests is insufficient and the test procedure is too time-consuming. To create a feasible alternative to the LAL test, the PEI aims at developing innovative methods on the basis of new technologies which not only reach the sensitivity of the current LAL tests (100 fg/ml) but can also be performed within few hours. The sensitivity required shall be achieved by an enrichment method for endotoxin using beads charged with LPS-affinity ligands; that mechanism was tested successfully in preliminary assays at the PEI. The ligands (e.g. human LPS binding protein, human CD14) will be cloned and produced by genetic engineering. Different methods including mRNA detection coding for cytokines IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha using Real Time RTPCR and detection of the above mentioned cytokines by flow cytometry will be used to perform the tests in a shorter period of time.

**Verbundprojekt: Prävalidierung und Validierung der CULTEX Methode: In-vitro-Bestimmung der akuten Toxizität inhalativ wirkender Feinstäube und Nanopartikeln nach Direktexposition kultivierter Zellen vom Respirationstrakt des Menschen**

**Förderkennzeichen:0315710 A bis C**

**Laufzeit: 01.05.2010 bis 30.04.2012**

**Kurzfassung:**

Ziel des Forschungsprojektes ist die Reduktion von Tierversuchen im Bereich der akuten Inhalationstoxikologie mittels einer standardisierten *In-vitro* Direktexpositionsmethode zur Untersuchung partikelhaltiger Atmosphären. Aufgrund der anstehenden Umsetzung des neuen europäischen Chemikaliengesetzes REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) und der aktuellen Diskussion bezüglich des Gefährdungspotentials von inhalierbaren Partikeln wird davon ausgegangen, dass diese standardisierte *In-vitro* Methode in die OECD Test Guideline 403 aufgenommen wird.

Drei Laboratorien mit entsprechender Expertise (Zellbiologie des Respirationstraktes, Direktexposition kultivierter Zellen an der Luft-IFlüssigkeitsgrenzschicht) erheben hierfür Daten z.B. zur akuten Toxizität (siehe Tabelle 1) an Lungenzellen vom Menschen (z.B. A549) nach Exposition mit ausgewählten Partikeln. Dosimetrische Aspekte zum relativen Vergleich des toxischen Potentials der verschiedenen Stäube sind hier von besonderer Bedeutung. Die Daten werden zur Beurteilung der Intra- und Inter-Laboratoriumsvariabilität herangezogen und sollen Aufschluss über die Reproduzierbarkeit, Robustheit und Stabilität der Methode geben, sowie Grundlage für deren formale Prävalidierung bilden.

Gemäß den Anforderungen des Projektes werden die Methoden bezüglich Zellexposition, Kultivierung und Analyse zu Beginn der Studie etabliert und zwischen den Gruppen harmonisiert.

Tabelle 1: Endpunkte zur Beschreibung des zytotoxischen Potentials von inhalierbaren Partikeln

Projektpartner	CULTEX Laboratori	Universit ät	Institut f. Toxikologie	Subcontract or
Koordinator				
Biologische				
Zytotoxizität (WST				
Zytoskelett	+	+	+	
Histologie	+	+	+	
Apoptose Necrose	+	+	+	
Membranintegrität				
Glutathiongehalt	+	+	+	
Entzündung				
Statistik und Prädiktionsmodel				+

Die rot markierten Endpunkte werden von allen Laboratorien entsprechend den harmonisierten Standardarbeitsanweisungen durchgeführt, während die anderen Endpunkte zur Absicherung der derart erhobenen Daten herangezogen werden.

Die Expositionsexperimente werden mit ausgesuchten Partikelstäuben durchgeführt (DQ12, TiO<sub>2</sub>-P25, CB14, ZnO, BaSO<sub>4</sub>, ALOOH I, CeO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, CuO nano und CuO micro) in allen drei Laboratorien durchgeführt.

Die ermittelten Ergebnisse werden dann mit vorhandenen tierexperimentellen Daten der Literatur verglichen. Dies ermöglicht eine Bewertung der *in-vitro* Methode und die Erstellung eines vorläufigen Prädiktionsmodells. Literaturdaten zur Bewertung der In-vitro Methode und der Erstellung eines Prädiktionsmodells (PM).

In der sich anschließenden 2. Projektphase werden dem Prävalidierungskonzept von ECVAM folgend, die Ergebnisse entsprechend den wissenschaftlichen Anforderungen der OECD validiert. Ein separater Förderungsantrag soll für diese Phase eingereicht werden.

**Kontaktdaten des Koordinators:**

Prof. Dr. Michaela Aufderheide  
Cultex Laboratories GmbH  
Feodor-Lynen-Straße 21  
30625 Hannover  
Deutschland  
Phone + 49(0) 511 56 35 86 111  
Fax +49(0) 511 56 35 86 69  
[m.aufderheide@cultex-laboratories.com](mailto:m.aufderheide@cultex-laboratories.com)

## Title

**Prevalidation and validation of the CULTEX method: *In vitro* analysis of the acute toxicity of inhalable fine dusts and nanoparticles after direct exposure of cultivated human cells from the respiratory tract.**

### Overview summary:

The aim of the research project is the reduction of animal studies in the field of acute inhalation toxicology by a standardized in-vitro direct exposure method for studying particulate atmospheres. In view of the upcoming implementation of the new European chemical legislation REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) and the current discussion about hazardous effects of inhalable particles, it is expected that this standardized in-vitro method will be included in the OECD Test Guideline 403.

For this purpose, three laboratories with corresponding expertise (cell biology of the respiratory tract, exposure of cultivated cells directly at the air/liquid interface) will generate data, e.g. with regard to cytotoxicity (Table 1), on human lung cells (e.g. A549) after exposure to selected particles. Special emphasis will be placed on dosimetric aspects for the relative comparison of the toxicological potency of different dusts. The data will be used for the evaluation of the inter- and intra-laboratory variability, providing information on the reproducibility, robustness and stability of the method and a basis for the respective formal validation requirements.

In compliance with the requirements of the project, the methods will be established in the individual laboratories at the beginning of the project and subsequently harmonized between the groups with a focus on cultivation, cell exposure and data aspects.

Table 1: Endpoints for characterizing the cytotoxic potency of inhalable particles

Project partner	CULTEX Laboratories	University of Mainz	Institute of Toxicology, Bundeswehr	Subcontractor seh consulting
Coordinator				
Biological				
Cytotoxicity (VVST)				
Cytoskeleton	+	+	+	
Histology	+	+	+	
Apoptosis/necrosis	+	+	+	
Membrane				
Glutathione	+	+	+	
Inflammation				
Statistics & Prediction				+

The endpoints marked with red asterisks will be performed by all laboratories according to harmonized Standard Operating Procedures, whereas the other parameters may be used for confirmation of the data.

Exposure experiments will be carried out with selected particles (DQ12,  $TiO_2$ -P25, CB14, ZnO, BaSO<sub>4</sub>, ALOOH 1, CeO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, CuO nano and CuO micro) in all three laboratories.

The generated results will be mainly compared to data available from animal experiments. This allows the assessment of the relevance of the *in-vitro* method and the development of a preliminary prediction model (PM),

In a second phase, based on the prevalidation concept of ECVAM, the results of the study will be validated according to the scientific requirements of the OECD. A separate application for funding (2 years) will then be submitted for this period.

**Contact data of the coordinator:**

Prof. Dr. Michaela Aufderheide  
Cultex Laboratories GmbH  
Feodor-Lynen-Straße 21  
30625 Hannover  
Germany  
Phone + 49(0) 511 56 35 86 111  
Fax +49(0) 511 56 35 86 69  
[m.aufderheide@cultex-laboratories.com](mailto:m.aufderheide@cultex-laboratories.com)

## **Verbundprojekt: Prävalidierung des Ex-vivo-Modells „Precision-Cut Lung Slices“ zur Vorhersage respirationstoxikologischer Effekte**

**Förderkennzeichen:0315720 A bis C**

**Laufzeit: 01.06.2010 bis 31.05.2013**

Die Umsetzung der europäischen Regelungen zur Registrierung, Bewertung und Zulassung neuer und bereits auf dem Markt befindlicher Chemikalien (REACH) wird die Anzahl der eingesetzten Versuchstiere steigen lassen, sofern nicht rechtzeitig neue In-vitro-Tests und Teststrategien zur Verfügung stehen. Auch die 7. Änderungsrichtlinie zur europäischen Kosmetikverordnung 76/768/EEC forciert die Entwicklung alternativer Verfahren. Die zwingende Notwendigkeit, im Bereich der Inhalationstoxikologie alternative Verfahren nach dem Leitgedanken des 3-R-Prinzips zu entwickeln, bildet derzeit die Grundlage für die Verwendung organtypischer Lungenzellkulturen. Durch den Einsatz lebendigen Lungengewebes (Precision-Cut Lung Slices, PCLS) als Ex-vivo-Modell der akuten Lungenschädigung können Chemikalien zum Teil ohne Tierversuche auf ihre Inhalationstoxizität getestet werden. Hier ist es machbar, mit weniger Tieren Ergebnisse zu erzielen (Verringerung von Tierversuchen) und die inhalative Exposition von Tieren in Vorstudien zu vermeiden (geringere Belastung der Tiere). Für die Risikobewertung hingegen ist die Bedeutung von In-vitro-Verfahren sehr begrenzt und es ist bislang nicht möglich, Tiermodelle zur Beurteilung der inhalativen Exposition gegenüber Chemikalien im Rahmen von Zulassungsverfahren vollständig zu ersetzen.

Ziel dieses Projektes ist die Prävalidierung lebendiger Lungengewebeschnitte zur Bestimmung toxikologischer Schwellenwerte von Chemikalien in Inhalationsstudien zur Dosisfindung (DRF) für regulatorische Zwecke gemäß OECD-Richtlinie 403/433/436 (akute Inhalationstoxizität, verabschiedet am 12. Mai 1981). In der Regel werden von jeder Chemikalie über 5 oder 14 Tage drei verschiedene Dosierungen an Versuchstieren getestet, wobei jede Gruppe 5 Tiere umfasst. Solche Dosisfindungsstudien sollen durch Tests an Gewebekulturen ersetzt werden. Nach erfolgreicher Validierung des Modells könnten ca. 20% der inhalationstoxikologischen Studien ersetzt werden. Dies entspräche ca. 6.000 Versuchstieren pro Jahr.

Typische Zeichen einer Schädigung des Lungengewebes durch Chemikalien sind z. B. zelluläre Veränderungen und eine Entzündung der Atemwege. Sowohl die zellulären Veränderungen als auch die Ausschüttung entzündungsbedingter Zytokine als messbare Parameter können in dem organtypischen Gewebemodell gleichzeitig beurteilt werden (Nassimi *et al.*, 2009, Henjakovic *et al.*, 2008b). Es ist somit möglich, sowohl die lokale Atemwegsreizung als auch die durch Chemikalien hervorgerufene Entzündung zu charakterisieren. Die Verwendung von Lungengewebe bietet die Gelegenheit, Alveolen mit ihren vielen verschiedenen Zellarten zu exponieren, um die Wirkung von Chemikalien direkt im Gewebe zu analysieren. Im Rahmen des BMBF-Projekts werden organtypische Gewebekulturen für kurze Zeit gegenüber zunehmenden Konzentrationen 20 ausgewählter Chemikalien exponiert. Für jede Chemikalie werden die Zellvitalität ( $CV_{50}$ ) und die induzierten Zytokine quantifiziert. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wird ein zweistufiger Ansatz verwendet: (I) einfache Bestimmung von Veränderungen der Zellvitalität durch Messung frei gewordener Zellkomponenten wie Laktatdehydrogenase (LDH) und durch Erfassung von Veränderungen in der Aktivität von Stoffwechsellzymen (Wst-1-Assay), (II) anschließend Fluoreszenzfärbung von toten und lebenden Zellen. Durch den Vergleich mehrerer Vitalitätspunkte wird die Bewertung der Zytotoxizität verbessert und Fehlinterpretationen vermieden, zu denen es sonst bei starken Chemikalien, die eine deaktivierende Wirkung auf enzymatische Tests haben, kommen kann. Es soll eine Strategie entwickelt werden, die es gestattet, Beziehungen zu veröffentlichten Daten zur Inhalationstoxizität herzustellen. Dabei wird ein einfacher Vergleich der toxikologischen Endpunkte durchgeführt, um die in PCLS bestimmte toxische *In-vitro*-

Konzentration für die In-vivo-Expositions-dosis zu extrapolieren und relevante *In-vivo-Dosen* vorherzusagen.

Die Prävalidierung wird in einer Ringstudie mit drei teilnehmenden Labors (Fraunhofer ITEM, BASF SE, RWTH Aachen) durchgeführt. Das BfR wird als vierter Projektpartner wissenschaftliche Beratung leisten, für eine effiziente Durchführung des Projektes sorgen und die biometrische Analyse der gewonnenen Daten durchführen. Das Projekt ist auf drei Jahre ausgelegt. Die in diesem Projekt gewonnenen Ergebnisse des Ringversuchs zur Validierung von PCLS werden in internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht. Anschließend muss eine weitere Validierung des Prototyps dieses Ex-vivo-Verfahrens durch das Europäische Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (ECVAM) erfolgen.

**Koordinator:** PD Dr. Armin Braun, Fraunhofer ITEM, Nikolai-Fuchs-Str. 1, 30625 Hannover, e-mail: [armin.braun@item.fraunhofer.de](mailto:armin.braun@item.fraunhofer.de), Telefon: +49 (0)511 5350-263

Der Koordinator ist verantwortlich für die Erfüllung der Verpflichtungen, die Leitung der Projektgruppe und die Koordination der verschiedenen Projektteile.

**Projektpartner:** Fraunhofer ITEM (PD Dr. Armin Braun, Dr. Katherina Sewald) BASF (Dr. Robert Landsiedel, Dr. Susanne Böhn) RWTH Aachen (PD Dr. Christian Martin) BfR, ZEBET (Dr. Manfred Liebsch), Beratung

Die Partner sind hauptsächlich an der Prävalidierung des PCLS-Modells im Rahmen der Ringstudie beteiligt. Messungen zur chemikalieninduzierten Reizung und Entzündung werden in allen teilnehmenden Labors durchgeführt. Von drei Partnern werden die 20 Chemikalien geprüft. Das BfR, ZEBET wird sich wesentlich in die Bewertung der In-vitro-Ergebnisse im Vergleich zu In-vivo-Daten einbringen.

## **Title:Prevalidation of *ex vivo* mode) precision-cut lung slices for prediction of respiratory toxicity**

Implementation of the EU regulation on the registration, evaluation, and authorisation of new and existing chemicals (REACH) will increase the number of experimental animals used, unless new *in vitro* tests and test strategies will be available in time. The 7<sup>th</sup> amendment to the Cosmetics Directive 76/768/EEC also pushes the development of alternative methods. The imperative to develop alternative methods in the field of respiratory toxicology in the context of the "three R's" is currently the basis for the employment of organotypic lung cultures. By using live lung tissue (precision-cut lung slices, PCLS) as an *ex vivo* mode of acute pulmonary injury chemicals can partly be tested for respiratory toxicity without any animal experiments. In this case, it is feasible to obtain results with fewer animals (reduction) and to avoid inhalation exposures of animals in pre-studies (refinement). The impact of *in vitro* methods in risk assessment, however, is clearly limited, and so far no full replacement of the use of animal models for the evaluation of inhalation exposure to chemicals in regulatory processes can be achieved.

The aim of this project is the prevalidation of live lung tissue for determination of toxic thresholds of chemicals in dose range finding (DRF) inhalation studies for regulatory purposes according to guideline *OECD 403/433/436* (acute inhalation toxicology, adopted May 12, 1981). Usually three doses of each chemical are tested in animals for 5 or 14 days, with 5 animals/group. Those DRF studies should be replaced by experiments in tissue culture. After validation of the model about 20% of inhalation toxicology studies could be replaced. This equals about 6,000 animals per year.

Characteristic features of chemically induced injury to lung tissue are e.g. cellular changes and respiratory inflammation. Both cellular alterations and release of inflammatory cytokines as quantifiable parameters can be assessed simultaneously in the organotypic tissue model (Nassimi *et al.*, 2009, Henjakovic *et al.*, 2008b). Hence, it is possible to characterise local respiratory irritation as well as inflammation induced by chemicals. The use of lung tissue provides the chance to expose alveoli with many cell types to analyse the impact of chemicals directly in tissue. Within the BMBF project, organotypic tissue cultures will be short-term exposed to increasing concentrations of 20 selected chemicals. For each chemical, cell viability (*CV<sub>50</sub>*) and induced cytokines will be quantified. A two-tiered approach will be used for the determination of cytotoxicity: (I) simple determination of changes in cell viability, as measured by the leakage of cell components such as lactate dehydrogenase (LDH), and by changes in metabolic enzyme activity (Wst-1 assay), (II) followed by live/dead fluorescence staining. Comparisons of several viability endpoints will improve the assessment of cytotoxicity and avoid misinterpretation which may occur with strong chemicals having an inactivating effect on enzymatic assays. A strategy allowing correlation to published inhalation toxicity data will be developed. It will include a simple comparison of the toxicity endpoints to extrapolate the *in vitro* toxic concentration determined in PCLS to *in vivo* exposure levels and to predict *in vivo* relevant doses.

The prevalidation will be conducted in a ring trial with three participating laboratories (Fraunhofer ITEM, BASF SE, RWTH Aachen). BfR will be a partner for scientific advice, efficient conduct of the project, and biometric analysis of the obtained data. The project is planned to take three years. Results of the interlaboratory validation of PCLS obtained within the project will be published in international journals. Further validation of the prototype *ex vivo* assay has to be proven by the European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM).

**Coordinator:** PD Dr. Armin Braun, Fraunhofer ITEM, Nikolai-Fuchs-Str. 1, 30625 Hannover, Germany, e-mail: [armin.braun@item.fraunhofer.de](mailto:armin.braun@item.fraunhofer.de), phone: +49 (0)511 5350-263

The coordinator will have the responsibility for fulfilling the obligations, leading the project team, and coordinating the different project parts.

**Partners:** Fraunhofer ITEM (PD Dr. Armin Braun, Dr. Katherina Sewald) BASF (Dr. Robert Landsiedel, Dr. Susanne Böhn)  
RWTH Aachen (PD Dr. Christian Martin)  
BfR, ZEBET (Dr. Manfred Liebsch), Consulting

The partners are essentially involved in the interlaboratory prevalidation of the PCLS model. Measurements for irritation and inflammation induced by chemicals will be performed by all participating laboratories. Twenty chemicals will be evaluated by three partners. The BfR, ZEBET will be strongly involved in the evaluation of the *in vitro* results in comparison to *in vivo*.

**Projekt: Entwicklung eines „Contact Allergen Activated T-Gell (CAATC)-Assay“ mit dendritischen Zellen der Haut: Sensibilisierungsnachweis über den Endpunkt „LC-induzierte Expression von linienspezifischen T-Zell-Transkriptionsfaktoren**

**Förderkennzeichen:0315724**

**Laufzeit: 01.07.2010 bis 30.06.2012**

**Kontaktinformationen des Projektleiters:** Dr. Matthias Peiser, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Abteilung Produktsicherheit, Experimentelle Forschung, Thielallee 88-92, 14195 Berlin, Tel.: 030-8412-3414, Fax: 030-8412-3763, E-Mail: Matthias.Peiser@bfr.bund.de

**Kurzbeschreibung:** Im vorliegenden Projekt soll ein Testsystem entwickelt werden, das es ermöglicht, ein sensibilisierendes Potential von Kontaktallergenen als qualitativ und quantitativ erfassbare Immunantwort in toxikologische Endpunkte zu transferieren. Diese Endpunkte sind die Expressionsinduktionen von linienspezifischen Transkriptionsfaktoren in T-Zell-Subpopulationen. Ein solches Testsystem wäre in der Lage, die Zellteilung und Differenzierung der tatsächlichen Effektorzellen einer Hypersensibilitätsreaktion, T-Helfer(Th)-Zellen und zytotoxische T-Zellen (CTLs), zu detektieren. Um eine Allergie Typ IV-Reaktion der Haut *in vitro* nachzubilden, sollen in dem beantragten Projekt dendritische Zellen wie sie in der menschlichen Epidermis vorkommen, sogenannte Langerhans-Zellen (LCs), in einem neu zu etablierenden T-Zell-Aktivierungsassay („Contact Allergen Activated T-Gell (CAATC)-Assay“) eingesetzt werden.

"Monocyte-derived Langerhans Gell-Ilke Cells" (MoLCs) werden in getrennten Versuchsansätzen mit sieben Kontaktallergenen (klassifiziert als stark und weniger stark) und fünf Nicht-Sensitizern stimuliert. Diese Zellen fungieren als *in vitro* Surrogat für LCs, die *in vivo* als aktivierte Zellen zum Lymphknoten wandern. In Kokulturen dieser LCs mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden letztere nach zellulärer Interaktion in Richtung spezifischer Effektor-T-Zellen polarisiert. Mehrere Endpunkte werden im CAATC-Assay detektiert: 1. Die quantitativ zu erfassende, chemotaktische Migration der LCs durch 8 lam Poren des Transwell-Systems; 2. Durchflusszytometrische Oberflächenmarker-Charakterisierung von kostimulatorischen und Adhäsions-Molekülen der LCs; 3. Expressionen von Effektor-T-Zellsubpopulationsspezifischen Transkriptionsfaktoren durch quantitative Real-Time-PCR.

Dabei wird erstmals die Eignung der Transkriptionsfaktoren Runx3, T-bet, GATA-3, RORC2 und *FOXP3* als funktionelle Marker für die Induktion von CTLs, T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, T<sub>H</sub>17- oder regulatorischen T-Zellen (T<sub>REG</sub>) in einem *in vitro* Allergen-Testsystem untersucht. Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen dieser Effektor-T-Zellen sollen eine Identifikation von spezifischen Markern auf den LC-Stimulatoren in der Kokultur ermöglichen und somit als ein feedback-Parameter für deren Aktivierungsstärke dienen.

Weitere Marker sollen in einer anschließenden Phase durch Microarray-Analysen der LCs aus den qRT-PCR-analysierten Kokultur-Situationen identifiziert werden. Schließlich wird das Testsystem auf die direkt verfügbare, LC-ähnliche Zelllinie MUTZ-3 angepasst. Damit stünde ein robustes und tierversuchsfreies *in vitro*-Korrelat zu der im menschlichen Körper ablaufenden Induktion einer differenzierten Kontaktallergie-Antwort des Immunsystems zur Verfügung.

## Summary

**Project title: "Development of a „Contact Allergen Activated T-Cell (CAATC)-Assay" using dendritic cells from skin: characterization of the sensitizing potency of chemicals via dendritic cell-induced expression of lineage specific T cell transcription factors"**

**Contact Information project Leader:** Dr. Matthias Peiser, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Abteilung Produktsicherheit, Experimentelle Forschung, Thielallee 88-92, 14195 Berlin, Tel.: 030-8412-3414, Fax: 030-8412-3763, E-Mail: Matthias.Peiser@bfr.bund.de

**Abstract:** We propose to develop an *in vitro* testing system capable of characterizing the sensitizing potency of contact allergens through measurement of the intensity of induced immune cell responses via certain biological endpoints, i.e. expression of lineage specific transcription factors in T cell subpopulations. This testing system would allow to detect cell proliferation and differentiation of the true effector cell populations responsible for hypersensitivity reactions, T-helper(TH) cells and cytotoxic T cells (CTLs). To simulate the chemically induced allergy type IV-reaction of human skin *in vitro*, we will apply dendritic cells as they occur in human epidermis, so called Langerhans cells (LCs), in a T cell activation assay („Contact Allergen Activated T Cell (CAATC)-Assay").

In individual experiments, monocyte-derived Langerhans Cell-like Cells (MoLCs) will be stimulated with seven sensitizers (classified as strong and less strong) and five non-sensitizers. These cells can be considered as surrogates for LCs *in vivo* that migrate to the regional lymph nodes as activated cells. In cocultures of LCs together with CD4<sup>+</sup> T cells, polarization of naive T cells toward specific effector T cells will be induced after subsequent interaction. The following biological endpoints will be explored in the CAATC-Assay: 1. Chemotactic migration of LCs through a 8 µm porous of a Transwell-system; 2. Flow cytometric characterization of cell surface markers like costimulatory and adhesion molecules on LCs; 3. Expression of transcription factors specific for effector T cell subpopulations by quantitative real-time-PCR.

In our *in vitro* allergy testing system the transcription factors Runx3, T-bet, GATA-3, RORC2, and FOXP3 will be evaluated for the first time according to their eligibility to serve as functional markers for induction of CTLs, TH1, TH2, TH17, or regulatory T cells (TReg). qRT-PCR analyses of the expression of effector T cells are expected to point to specific surface markers on LC-stimulators in coculture and thereby serve as a feedback parameter for the strength of activation.

Further markers will subsequently be identified in the "Simplify phase" through microarray analyses of LCs derived from qRT-PCR analyzed cocultures. Finally the testing system will be adopted to immediately available LC-like cell line MUTZ-3. As a result of our project a robust and animal-free *in vitro* assay will be available capable of indicating the induction of a differentiated contact allergy response of the immune system that may occur in the human body upon exposure to chemical sensitizers.

**Verbundprojekt: Erweiterte Prävalidierungsstudie zur Prüfung der toxischen Wirkung von inhalativ wirksamen Stoffen (Gase) nach Direktexposition von Lungenzellen des Menschen an der Luft-IFlüssigkeitsschicht**

**Förderkennzeichen:0315792 A bis D**

**Laufzeit: 01.08.2010 bis 31.07.2012**

Die Akzeptanz für einen breiten Einsatz einer standardisierten, robusten und prädiktiven *in-vitro* Methodik für die Bewertung der Toxizität bei luftgetragener Exposition hat sich erst in jüngster Zeit deutlich verbessert (Überarbeitung OECD Prüfrichtlinien 403, 436; Guidance Dokument 39; REACH Verordnung).

Ziel des Vorhabens ist die abschließende Prävalidierung der ALI Technologie ("ALI = airliquid-interface") als einer *in-vitro* Methodik zur Bestimmung des toxischen und genotoxischen Potentials von inhalierbaren Stoffen (Gasen) durch luftgetragene Exposition an einer Lungenzelllinie vom Menschen (A-549). Die Ergebnisse der ersten Studienphase in der Prävalidierung dieser Methode dokumentierten sehr gute intra-Labor Reproduzierbarkeiten und inter-Labor Vergleichbarkeiten. Vor diesem Hintergrund wird das Projekt von dem Konsortium (Fraunhofer-ITEM, Hannover; BAuA Berlin; BfRZEBET, Berlin und UFZ-Leipzig) mit dem Ziel der Erweiterung der Datenbasis durchgeführt. Insgesamt 4 Modellgase mit Toxizitätspotential und 2 Gase als Negativsubstanzen werden ergänzend in die Untersuchungen einbezogen.

Auf der Grundlage des erarbeiteten Datenmaterials werden unter Einbeziehung von Tierversuchsdaten (Literaturdaten) Analysen zum Zusammenhang zwischen In-vitro- und In-vivo-Studien und die Entwicklung eines Prädiktionsmodells (PM) durchgeführt. Damit soll eine sichere Bewertung dieser Alternativmethode vor Eintritt in eine umfangreiche internationale Validerungsphase erfolgen.

Kontaktinformationen des Projektkoordinators:

Dr. J.W. Knebel  
Fraunhofer Institut  
ITEM  
Nikolai-Fuchs-Str. 1  
30625 Hannover

Tel. 0511-5350-0

Fax. 051

1-5350-155

e-mail: [knebel@item.fraunhofer.de](mailto:knebel@item.fraunhofer.de)

## Brief Description

### **Extended prevalidation study to test the toxic effects of inhalable substances (gases) after direct exposure of human lung cells at the air/liquid Interface**

The acceptance of a more expanded application of a standardized, robust and predictive in vitro methodology for the toxicity evaluation after airborne exposures has improved significantly only in recent times (e.g. Draft proposals of OECD testing guideline 403, 436 and Guidance document 39; REACH regulation), This project aims to extend a current pre-validation study towards an in vitro methodology for the investigation of the toxic and genotoxic potential of inhalable substances by airborne exposure of the human lung cell line A-549 using the ALI technology ("ALI = air-liquid-interface"). Results of the first pre-validation Phase demonstrate a good intra- and inter-laboratory reproducibility. Against this background, the present follow-up project which mainly aims at the database extension, will be performed of the consortium (Fraunhofer-ITEM, Hannover; BAuA, Berlin; BfR-ZEBET, Berlin; UFZ-Leipzig). A total of four test gases with toxic potency and two test gases which serve as a negative control will be investigated. Based on the data material obtained and taking into account existing data from animal experiments (literature data), analyses will be performed regarding the relation between in vitro and in vivo studies and a prediction model (PM) will be developed. Before entering the international validation phase the enlargement of the database will therefore guarantee a secure assessment of this alternative method,

#### Contact:

Dr. J.W. Knebel  
Fraunhofer Institut  
ITEM  
Nikolai-Fuchs-Str. 1  
30625 Hannover

Tel. 0511-5350-0  
Fax. 051 1-5350-155  
e-mail: [knebel@itern.fraunhofer.de](mailto:knebel@itern.fraunhofer.de)

## **Verbundprojekt: Prävalidierung des HET-MN (Hen's Egg Test - Micronucleus Induction) als Ersatzmethode zur *in vivo* Mikrokernprüfung an Nagern**

**Förderkennzeichen:0315803 A bis C**

**Laufzeit: 01.09.2010 bis 31.08.2012**

### Projektbeschreibung

Der Gesetzgeber hat mit der Novellierung der Chemikalienrichtlinie unter REACH und der 7. Änderung der Kosmetikrichtlinie seine Bestrebungen Tierversuche zur Sicherheitsbewertung von Chemikalien zu reduzieren, in den letzten Jahren deutlich vorangetrieben. Die zu ersetzenden Prüfungen stellen wesentliche Bestandteile in behördlichen Anmelde- bzw. Zulassungsverfahren dar (z.B. bei Industriechemikalien und Arzneimitteln). Für den Endpunkt Genotoxizität stehen zwar seit Jahren validierte *in vitro* Methoden zur Verfügung, allerdings vermögen sie nur unzureichend, das tatsächliche Gefährdungspotential vorherzusagen (Kirkland *et al.*, 2005). Mit dem Hen's Egg Test for Micronucleus Induktion (HET-MN), ist an der Universität Osnabrück ein viel versprechender *in vitro* Test entwickelt worden (Wolf *et al.*, 1997, 2002, 2003, 2008), um die Testbatterien zur Bestimmung des genotoxischen Potentials zu ergänzen. Er verbindet den etablierten genotoxischen Endpunkt „Induktion von Mikrokernen“ mit dem gut charakterisierten Modell des angebrüteten Hühnereis, das die metabolische Aktivierung, Eliminierung und Exkretion von Substanzen erlaubt und bereits bei anderen etablierten Alternativmethoden Anwendung findet (z.B. beim HET-CAM). Der HET-MN prognostiziert sowohl klastogene (DNS-strangbrechende) als auch aneugene (Chromosomen-fehlverteilende) Effekte von Prüfsubstanzen. Daher könnte die Methode insbesondere als Alternative für den *in vivo* Mikrokerntest (OECD Richtlinie 474) sowie den Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (OECD Richtlinie 475) fungieren. In einem Vorläuferprojekt (0315278) wurde die Methode vom Originatorlabor der Universität Osnabrück zur Henkel AG & Co. KGaA transferiert und das Methodenprotokoll finalisiert. Dieser erste Schritt demonstrierte die generelle Übertragbarkeit von einem akademischen Labor zu einem anwendungsorientierten Industriepartner. Die anschließende Substanztestung, die parallel in beiden Labors erfolgte, bestätigte die hohe Vorhersagekraft der Methode (15 von 16 Substanzen wurden richtig erkannt) und zeigte eine gute Intra- und Inter-Laborreproduzierbarkeit.

Ziel des Anschlussprojektes (31P5927) ist die formale Prävalidierung des HET-MN. Neben Henkel nehmen mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) und dem

Forschungsauftragsinstitut Harlan zwei weitere Labore teil. Das im Vorprojekt erarbeitete Prädiktionsmodell, wird im aktuellen Projekt auf seine Transferierbarkeit und Reproduzierbarkeit anhand bisher noch nicht im HET-MN getesteter Substanzen verifiziert und ggf. optimiert. Langfristig soll eine validierte und behördlich anerkannte Prüfmethode für den toxikologischen Endpunkt Genotoxizität bereitgestellt werden. Die Projektergebnisse sollen publiziert werden.

Projektkoordinatorin:  
Dr. Kerstin Reisinger  
Henkel AG & Co. KGaA  
Henkelstr. 67  
40589 Düsseldorf  
Germany  
Phone: +49-211-797-2979  
E-Mail: kerstin.reisinger@henkel.com

Pre-validierung of the HET-MN (Hen's Egg Test - Micronucleus Induction) as an alternative method for the *in vivo* micronucleus test (OECD guideline 474)

#### Project Summary

*In the frame of the new chemical legislation REACH and the 7<sup>th</sup> Amendment to the EU Cosmetics Directive the legislator has significantly intensified its efforts to reduce animal testing in the safety assessment of chemicals during recent years. The test methods to be replaced in the near future are mandatory for certain regulatory registration and approval procedures (cosmetics, industry chemicals, pharmaceuticals etc.). For the toxicological endpoint genotoxicity validated *in vitro* methods are already available. However, they usually suffer from insufficient prediction of the chemical's real, *in vivo* genotoxic potential. The Hen's Egg Test for Micronucleus Induction (HET-MN) which was developed at the University of Osnabrueck (Wolf *et al.*, 1997, 2002, 2003, 2008) is a promising tool to supplement existing test batteries to obtain results of higher (more precise) predictivity. The method combines the established endpoint "induction of micronuclei" with the well characterized model of the bred hen's egg which enables metabolic activation, elimination, and excretion applied since years in accepted *in vitro* tests like the HET-CAM. The HET-MN detects clastogens (DNA strand breaking agents) and aneugens (chromosomes missegregation inducing agents) respectively. Therefore, the test method is especially considered as an alternative for the *in vivo* micronucleus*

test (OECD guideline 474) and the Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (OECD guideline 475).

In a recent project (0315278) the method was successfully transferred from the University of Osnabrueck to the Henkel AG & Co. KGaA as an industrial partner. Subsequently, the protocol has been finalized and further compound testing confirmed the good predictivity of the assay (15 of 16 substances were identified correctly) and also demonstrated a good intra- and inter-laboratory reproducibility.

Following the steps recommended by ECVAM for the acceptance of an *in vitro* assay the aim of the current project is to achieve the pre-validation of the HET-MN. The three participating laboratories Henkel, the Federal Institute for Risk Assessment (BfR) and the research contract organization Harlan together will verify, and if necessary optimize a prediction model by applying coded chemicals not used before in the HET-MN. The long-term aim is to provide a fully validated and regulatory accepted method for the assessment of the toxicological endpoint genotoxicity. The results of the project will be reported to the public via conventional peer-reviewed scientific publication.

Project coordinator:  
Dr. Kerstin Reisinger  
Henkel AG & Co. KGaA  
Henkelstr. 67  
40589 Düsseldorf  
Germany  
Phone: +49-211-797-2979  
E-Mail: kerstin.reisinger@henkel.com

**Projekt: Projekt: Weiterentwicklung des LCSA unter Einbeziehung einer spezifischen T-Zell-Antwort**

**Förderkennzeichen: 0315544**

**Laufzeit: 01.02.2011 bis 31.01.2013**

**Zusammenfassung**

**Förderkennzeichen: 0315544**

**Kurzfassung:**

LCSA steht für *loose-fit coculture-based sensitization assay*. Mit diesem in der Arbeitsgruppe des Antragstellers entwickelten Testverfahren lässt sich *in vitro* das irritative und sensibilisierende Potential von Testsubstanzen quantifizieren. Der Test basiert auf der Kokultur primärer humaner Keratinozyten und Dendritischer Zellen. Die Aktivierung von Dendritischen Zellen stellt nur die Initialphase der Sensibilisierung dar. Im weiteren Verlauf kommt es zur Aktivierung von T-Lymphozyten und erst damit zur Ausbildung einer Allergie. Eine Substanz, die zwar Dendritische Zellen aktiviert, aber keine T-Zell-Antwort auslöst, würde daher im LCSA falsch-positive Ergebnisse liefern.

In der Weiterentwicklung des LCSA sollen im aktuellen Vorhaben T-Zell-Antworten als zusätzliche Endpunkte des Tests etabliert werden. Es sollen allogene T-Lymphozyten in das bestehende Testsystem integriert und nach Stimulation mit bekannten Allergenen über spezifische Antikörperfärbung differenziert und ihr Aktivierungsgrad bestimmt werden. Zudem soll eigenen experimentellen Hinweisen nachgegangen werden, nach denen auch die im LCSA bereits enthaltenen autologen T-Zellen über die Aktivierung der Keratinozyten zu einer Antwort stimuliert werden können. Im Rahmen der REACH-Verordnung müssen in den nächsten Jahren mehr als 30.000 Stoffe auf ihre Sicherheit getestet werden. Zu diesen Tests gehört auch die Prüfung auf das Risiko der Auslösung einer Kontaktallergie. Für Kosmetika sind ab 2013 keine Tierversuche mehr zulässig. Erweiterte Zielstellung ist es daher, einen Ersatz für den Tierversuch LLNA, *local lymph node assay*, an der Maus zur Bestimmung von sensibilisierendem/kontaktallergischem Potential zu entwickeln.

**Kontaktadresse:**

Prof. Dr. Ralf Stahlmann  
Charité Universitätsmedizin Berlin  
Campus Charité Mitte  
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
Luisenstr. 7, 10117 Berlin  
Tel.: +4930 450 525 571  
Email: ralf.stahlmann@charite.de

**Summary:**

**Project: Further development of LCSA including a specific T-cell response**

**Summary**

LCSA is the abbreviation for *loose-fit coculture-based sensitization assay*. This assay was developed in the applicant's group. Using the assay it is possible to quantify the sensitising and irritative potential of substances *in vitro*. The assay is based on a coculture of human primary keratinocytes and dendritic cells. The activation of dendritic cells represents only the initial phase of sensitization. During the next steps towards an allergy T-cells are activated. A substance which activates dendritic cells, but does not trigger a T-cell response will therefore give false-positive results when tested in the LCSA. Within the further development of the LCSA T-cell responses shall be established as additional endpoints.

Allogenic T-lymphocytes shall be integrated into the existing test system. The degree of their differentiation and activation state after stimulation with known contact allergens will be assessed by antibody staining. In addition, it is our aim to pursue preliminary experimental evidences from our laboratory that autologous T-lymphocytes - which are already included in the LCSA - could be stimulated to a response by activation through keratinocytes.

As a consequence of the REACH-regulation more than 30.000 substances have to be tested for their safety over the next years. These tests include assessment of the risk to induce a contact allergy. For cosmetic products animal testing is forbidden by 2013. It is thus the extended objective of this project to develop an alternative for the LLNA – the murine *local lymph node assay* - which is currently used for assessment of sensitising potential of xenobiotics.

**Contact:**

Prof. Dr. Ralf Stahlmann  
Charité Universitätsmedizin Berlin  
Campus Charité Mitte  
Institute for Clinical Pharmacology and Toxicology  
Luisenstr. 7  
10117 Berlin  
Tel.: +49 30 450 525 571  
Email: ralf.stahlmann@charite.de

**Verbundprojekt: Entwicklung einer Strategie zur Bildung von Kategorien und Definition neuer Kategorien für die Endpunkte der Subakuten, Subchronischen Toxizität zur Minimierung von Tierversuchen unter REACH - Kategorien REACH II, Teilprojekte 1 – 4**

**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0315546A, 0315546B, 0315546C, 0315546D**

**Laufzeit: 01.02.2011 bis 31.01.2014**

**Zusammenfassung**

Entwicklung einer Strategie zur Bildung von Kategorien und Definition neuer Kategorien für die Endpunkte der Subakuten, Subchronischen und Chronischen Toxizität zur Minimierung von Tierversuchen unter REACH

Zur Risikobewertung von Chemikalien im Rahmen von REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) sind umfangreiche tierexperimentelle Prüfungen erforderlich. Die europaweite rechtliche Regelung ist in Deutschland als REACHChemikalienverordnung (REACH-VO) umgesetzt und sieht vor, so weit wie möglich auf Tierversuche zu verzichten. Dafür besteht Bedarf an Methoden, welche die inhärenten toxischen Eigenschaften chemischer Stoffe vorhersagen können. Ziel dieses Projektes ist es, für die Abschätzung der Toxizität nach wiederholter Gabe eine innovative Strategie zur Bildung von Kategorien zu erarbeiten. Aufbauend auf publizierten In-vivo-Studien sollen Chemikalien aufgrund von gemeinsamen toxikologischen Eigenschaften (toxicological fingerprinting) mit chemischer Strukturähnlichkeit kombiniert und in Kategorien zusammengefasst werden. Mit Hilfe dieser 2-dimensionalen Matrix können dann die toxischen Eigenschaften von ungetesteten chemischen Stoffen abgeschätzt werden. Die Vorhersageregeln sollen in ein Produkt implementiert werden, welches Kategorisierung und (Q)SAR-Erstellung automatisiert vornehmen und Toxizitätsvorhersagen durchführen kann (Iazar).

Kontaktinformationen:

Dr. Annette Bitsch, Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Bereich Chemikalienbewertung, Hannover

Dr. Christoph Helma, Universität Freiburg: Freiburger Zentrum für Datenanalyse und Modellbildung (FDM), Freiburg

Prof. Dr. Stefan Kramer, Technische Universität München (TUM): Lehrstuhl XII Bioinformatik, München

Prof. Dr. Ralf Stahlmann und Prof. Dr. Ursula Gundert-Remy, Charite Universitätsmedizin Berlin: Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Berlin

Koordination: Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM)

**Summary**

Development of a strategy for setting up categories and definitions of new categories for the endpoints subacute, subchronic, and chronic toxicity in order to minimize animal experiments under REACH

Chemical risk assessment under REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) requires extensive testing of the substances to be evaluated in animal experiments. In Germany, the pan-European regulation has been implemented in the form of the REACH chemicals regulation (REACH-VO), which stipulates that animal experiments are to be avoided whenever possible. As a result, there is a need for methods that allow the inherent toxic properties of chemical substances to be predicted. The aim of this project is to develop an innovative strategy for setting up

categories that will enable an estimate of repeated-dose toxicity. Based on published in vivo studies, identical toxicological properties of chemicals (toxicological fingerprinting) in combination with similarity in the chemical structure shall be used to group substances in categories. This 2-dimensional matrix will then allow the toxic properties of untested chemical materials to be estimated. The prediction rules shall be implemented in a product that will be able to automatically assign chemicals to categories and identify (Q)SARs and thus make toxicity predictions (Iazar).

**Verbundprojekt: Verbesserung des Network Formation Assay (NFA) zur Reduktion von Tierversuchen im Rahmen der Neurotoxizitätsprüfung von Chemikalien**

**Förderkennzeichen der Teilprojekte: 0315545A und 0315545B**

**Laufzeit: 01.06.2011 bis 31.05.2014**

**Kurzfassung:**

Als eine Konsequenz von REACH, aber auch vor dem Hintergrund des Paradigmenwechsels in der Toxikologie (Tox-21 c), besteht Bedarf an neuen, schnellen und besseren in vitro Tests zur Abschätzung des toxischen Risikos durch Fremdstoffe. Der ‚*Network Formation Assay*‘ (NFA) ist eine neue, mikrochipbasierte in vitro Analyseplattform für die Untersuchung neurotoxischer Risiken durch Fremdstoffe. Im Verbundprojekt wird diese Plattform technologisch optimiert und systematisch vorvalidiert. Dabei wird angestrebt, den existierenden Ansatz in ein High-Throughput-Verfahren zu überführen. So sollen die technischen und wissenschaftlichen Voraussetzungen geschaffen, um den NFA als Ersatzmethode für Tierversuche bei den entsprechenden Stellen (ECVAM, ZEBET) validieren zu können.

Die Arbeitsplanung orientiert sich an vier Meilensteinen, in denen Mikrochips für (1) primäre Mausneurone und (2) stammzellabgeleitete Neurone entwickelt und etabliert werden, (3) haltbare Mikrochips entwickelt werden und (4) der prädiktive Wert des NFA mit bekannten Neurotoxinen demonstriert wird. Dazu wird die notwendige Mikrodrucktechnik zur Herstellung der beschichteten Mikrochips kontinuierlich verbessert, das Chip-Layout und die Oberflächenbeschichtung der Mikrochips den Anforderungen der unterschiedlichen Zellsysteme angepasst, unterschiedliche Konservierungstechniken (z. B. Kryotechnik) erprobt. In einer abschließenden Serie von zellbiologischen Experimenten mit vorselektierten Neurotoxinen, die unterschiedliche Schädigungsmechanismen aufweisen, wird der prädiktive Wert des optimierten NFA geprüft. Durch diese Experimente wird die Generalisierbarkeit der Ergebnisse durch die parallele Nutzung unterschiedlicher Zellsysteme sichergestellt. Neben dem Hauptziel den NFA als Ersatzmethode für Tierversuche zu etablieren und in eine modulare Testbatterie zu integrieren, sind die geplanten Experimente so angelegt, dass die Ergebnisse in hochrangigen Zeitschriften publiziert werden können. Neurobiologischen Arbeitsgruppen, die im Bereich der kognitiven und molekularen Neurowissenschaften arbeiten, könnten so für den NFA als Analyseplattform interessiert werden, um molekulare und zelluläre Grundlagen von Lernen und Gedächtnis zu untersuchen.

**Kontaktadresse:**

Dr. Dirk Janasek / Dr. Jonathan West  
Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - eV  
Miniaturisation  
Otto-Hahn-Str. 6b, 44227 Dortmund  
Tel: 0231 1392-4202, Fax: 0231 1392-4850, E-Mail [janasek@isas.de](mailto:janasek@isas.de); [west@isas.de](mailto:west@isas.de)

Dr. Christoph van Thriel (Koordinator)  
IfADo - Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund  
Verhaltenstoxikologie und Chemosensorik  
Ardeystr. 67, 44139 Dortmund  
Tel.: 0231 1084-407, Fax: 0231 1084-308, E-Mail: [thriel@ifado.de](mailto:thriel@ifado.de)

## **Summary:**

In response to REACH but also against the background of a paradigm shift in toxicology (Tox-21c) there is an urgent need for new, faster and more accurate in vitro tests for the toxicological risk assessment of xenobiotics. The 'network formation assay' (NFA) is a new, microchipbased platform for the assessment of neurotoxicity 'in vitro' that can reduce animal tests for this type of organ-specific toxicity. Within the joint research project the technology of this test platform will be optimized and pre-validated. Thereby, the existing "small-scale" approach should be upscaled to a 'high-throughput technology'. In doing so, the technical and scientific foundations will be laid to validate the NFA as an alternative test method at the respective authorities (ECVAM, ZEBET).

The work plan is divided into four milestones, namely the development of suitable microchips for (1) primary mouse neurons and (2) murine stem cell-derived neurons, (3) the fabrication of stable microchips, and (4) the demonstration of the predictive value of the optimized NFA by testing well-known neurotoxins. By continuous optimization of the microprinting technology appropriate surface coating methodologies for different cell types will be developed, the layout of the microchips will be adapted to the needs of the different cellular systems and different techniques (e.g. cryotechnology) to produce stable and shippable microchips. Using preselected neurotoxins with different modes of action a series of experiments will be conducted to demonstrate the predictive value of the NFA. By means of these final experiments in different cell systems the general applicability of the results will be challenged.

Aside from the major goal to establish the NFA as an alternative test system in a modular in vitro test battery for reducing/replacing animal testing in toxicology, the experiments are thought to be published in high-ranking journals. Thereby, researchers from neurobiology, especially from cognitive and molecular neuroscience might be attracted to the NFA and to study fundamental processes of memory and learning with the NFA platform.

## **Contacts:**

Dr. Dirk Janasek / Dr. Jonathan West  
Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - eV  
Miniaturisation group  
Otto-Hahn-Str. 6b, 0-44227 Dortmund, Germany  
phone: +49231 1392-4202, fax: +49231 1392-4850, email: janasek@isas.de; west@isas.de

Dr. Christoph van Thriel (Coordinator)  
IfAdo - Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors  
Neurobehavioral Toxicology and Chemosensation  
Ardeystr. 67, 0-44139 Dortmund, Germany  
phone: +49231 1084-407, fax: +49231 1084-308, email: thriel@ifado.de

## **BMBF-Förderkatalog**

Zur schnellen Übersicht steht der Förderkatalog des BMBF unter der Internetadresse <http://foerderportal.bund.de/foekat/jsp/StartAction.do> zur Verfügung, über die Leistungsplansystematik K02510 können Sie direkt Informationen über die geförderten Projekte zu den „Ersatzmethoden zum Tierversuch“ abrufen und darüber hinaus projektbezogen bei der Technischen Informationsbibliothek (TIB) in Hannover abfragen, ob der Abschlußbericht zum jeweiligen Projekt bereits verfügbar ist. Dort können auch einzelne Abschlußberichte zu den Konditionen der TIB bestellt werden.