



Fraunhofer
ITEM

FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR TOXIKOLOGIE UND EXPERIMENTELLE MEDIZIN ITEM

**JAHRESBERICHT
ANNUAL REPORT
2011**

FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR TOXIKOLOGIE UND EXPERIMENTELLE MEDIZIN ITEM

LEISTUNGEN UND ERGEBNISSE

JAHRESBERICHT 2011

Den englischsprachigen Teil des Jahresberichts finden Sie ab Seite 83. Die Rubrik »Namen, Daten, Ereignisse« beginnt in deutsch-englischer Version ab Seite 164.

For the English part of this Annual Report, please refer to page 83. The chapter "Names, Dates, Events" in both German and English begins on page 164.

INHALT

Vorwort	4
----------------	---

Das Institut im Profil	6
Schwerpunkte	6
Zukunftsfelder	9
Kuratorium	10
Personal und Betriebshaushalt	11
Organigramm Fraunhofer ITEM	12
Meldungen 2011	14

GESCHÄFTSFELD 1

Pharmaforschung, Pharmaentwicklung und Medizinische Biotechnologie	16
---	----

Projektberichte

Biopharmazeutika mit alternativen, zeitsparenden Verfahren herstellen	20
Epigenetische Mechanismen in Lungenkrebszellen	23
COPD: Zellkulturmodell für die Testung von Arzneimitteln	26
Fraunhofer-Projekt »Aeskulap«: Forscher entwickeln schnelle und sichere Sepsis-Diagnostik	29

Projektübersicht	31
-------------------------	----

GESCHÄFTSFELD 2

Klinische Atemwegsforschung	32
------------------------------------	----

Projektberichte

Universelles Allergenprovokationsverfahren in der Fraunhofer ECC validiert	36
Reproduzierbare Entzündungsreaktion nach segmentaler Endotoxinprovokation bei gesunden Probanden	38
RIBOLUTION: Neue Biomarker für Diagnostik und Therapie	42

Vorlauftforschung

Nicht-invasive Quantifizierung der Atemwegsentzündung mittels Kernspintomographie	44
Niedrig dosierte inhalative Endotoxinexposition – ein Modell für die frühe klinische Arzneimittelentwicklung	46
Pilotstudie: Wirkung von Gräserpollen auf Hautveränderungen bei Patienten mit Neurodermitis	48

Projektübersicht	49
-------------------------	----

GESCHÄFTSFELD 3

Gewerbe-, Umwelttoxikologie und Verbraucherschutz

50

Projektberichte

Analytische Methoden für die Risikobewertung von 3-MCPD und Glycidyl-Ester

54

Entwicklung und Erprobung von einfachen Tests zur Bewertung der Exposition und der Lungentoxizität von Consumer-Sprays

57

Effekte von inhalierten Titandioxid-Nano- und -Feinpartikeln auf die Lunge von Ratten

60

Projektübersicht

63

GESCHÄFTSFELD 4

Prüfung und Registrierung von Chemikalien, Bioziden und Pflanzenschutzmitteln

66

Projektberichte

Faktoren für die Zeitextrapolation bei Studien mit wiederholter Verabreichung

70

Vergleich der Methoden zur Ableitung von Grenzwerten für Chemikalien

73

Projektübersicht

76

Fraunhofer-Gesellschaft

78

Fraunhofer-Verbund Life Sciences

80

ANNUAL REPORT 2011

83

Namen, Daten, Ereignisse

164

Publikationen

164

Promotionen

167

Bachelorarbeiten

169

Geladene Vorträge auf Tagungen

170

Beiträge zu Tagungen

172

Mitarbeit in Gremien

174

Forschungsprojekte

178

Kooperationen mit Institutionen und Hochschulen

180

Gastwissenschaftler

182

Preise für wissenschaftliche Arbeiten

182

Messen, Kongresse und Seminare

183

VORWORT

Liebe Leserinnen und Leser,

das Jahr 2011 war für das Fraunhofer ITEM ein besonderes Jahr – konnten wir doch zurückblicken auf 30 Jahre erfolgreiche Gesundheitsforschung sowohl im präventivmedizinischen als auch im therapeutischen Bereich. Die Jubiläumsfeier öffnete aber gleichzeitig auch den Blick in die Zukunft, denn anlässlich der Feierlichkeiten erfolgte auch der erste Spatenstich für das Clinical Research Center Hannover – CRC Hannover. Mit diesem neuen Studienzentrum, das im Herbst 2013 seine Arbeit aufnehmen wird, erfährt die klinische Atemwegsforschung am Fraunhofer-Institut die dringend notwendige Erweiterung. Darüber hinaus ist dieses Zentrum auch ein exemplarisches Beispiel dafür, dass zwei außeruniversitäre Forschungsinstitute – Fraunhofer ITEM und Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung – und eine Universität – Medizinische Hochschule Hannover – in einem Forschungsgebäude für frühe klinische Studien zusammenarbeiten. Allen drei Institutionen ist es wichtig, die medizinische Translationsforschung, d. h. die Entwicklung von neuen Therapien und Diagnostika bis zur erfolgreichen Anwendung beim Patienten, voranzubringen.

»Grundsteine« wurden im vergangenen Jahr gleich mehrere gelegt, und das nicht nur in unserem Stammhaus in Hannover. Im Biopark in Regensburg hat der renommierte Forscher Professor Christoph Klein in Verbindung mit seinem Lehrstuhl an der Universität Regensburg eine Fraunhofer-Projektgruppe auf dem Gebiet der personalisierten Krebstherapie aufgebaut. Mit dieser Gruppe wird die Pharmaforschung und -entwicklung am Fraunhofer ITEM thematisch erweitert. Deutlich ausgebaut werden konnte auch der Standort in Braunschweig. Die dort ansässigen pharmazeutischen Biotechnologen haben neue und neu ausgestattete Räumlichkeiten auf dem Campus des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung bezogen. Insgesamt stehen jetzt etwa 2000 m² Labor- und Technikumsfläche für Verfahrensentwicklung, Scale-up, GMP-Produktion und Abfüllung zur Verfügung. Damit können die seit über zehn Jahren erfolgreich auf dem Markt der Biopharmazeutika tätigen Experten ihr Forschungs- und Dienstleistungsangebot deutlich erweitern.

Virtuell aufgebaut wurde 2011 das Deutsche Zentrum für Lungenforschung – ein deutschlandweiter Verbund von sechs exzellenten universitären und außeruniversitären Kooperationspartnern –, der sich mit einer langfristigen Förderung durch das BMBF eine schnelle Entwicklung von Diagnostika und neuen

Therapien gegen Lungenkrankheiten zum Ziel gesetzt hat. In diesem Verbund ist das Fraunhofer ITEM mit der Medizinischen Hochschule Hannover als Kooperationspartner eingebunden. Mit dem CRC Hannover unterstützt das Institut ein weiteres Gesundheitszentrum, das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung.

Das Fraunhofer ITEM kann also zuversichtlich in die Zukunft schauen. Viele Grundsteine sind gelegt, viele Projekte haben begonnen. Einen Überblick über unser Themenspektrum und einige Beispiele aus der aktuellen Forschung finden Sie in dem vorliegenden Jahresbericht 2011.

Für all das danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, den Kuratoren, Förderern und Kunden. Ohne ihr Engagement wären diese Fortschritte nicht möglich gewesen. Ich freue mich auf weitere gute Zusammenarbeit.



Prof. Dr. Dr. Uwe Heinrich
Geschäftsführender Institutsleiter



DAS INSTITUT IM PROFIL

SCHWERPUNKTE

Den Menschen in unserer industrialisierten Welt vor gesundheitlicher Gefährdung zu schützen und an der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze mitzuwirken – das sind die Ziele des Fraunhofer ITEM. Einen Schwerpunkt bildet die Atemwegsforschung: Über die Lunge werden unzählige luftgetragene Substanzen – Schadstoffe und auch Arzneimittel – aufgenommen. Gemeinsam mit unseren Kunden aus Industrie, Industrieverbänden, Berufsgenossenschaften und Behörden entwickeln und prüfen wir neue Medikamente gegen Atemwegserkrankungen – insbesondere gegen Asthma, Heuschnupfen und chronische Bronchitis –, erforschen Wirkmechanismen und ermitteln die Risiken von potenziellen Schadstoffen. Ein breites Spektrum an Kompetenzen ermöglicht es uns, Komplettlösungen anzubieten – von der Idee bis hin zum Produkt.

Im Fokus: Lunge und Atemwege

Der Respirationstrakt spielt bei den Untersuchungen am Fraunhofer ITEM eine zentrale Rolle. In In-vitro- und In-vivo-Modellen werden vornehmlich Stoffe untersucht, die inhalativ aufgenommen werden. Dazu gehören sowohl einzelne Komponenten, wie Faserstäube oder ultrafeine Partikel und Nanopartikel, als auch komplexe Gemische, die am Arbeitsplatz oder in der Umwelt entstehen, beispielsweise Automobilabgase oder Kokerei- und Bitumendämpfe.

Medikamente prüfen und entwickeln

Für entzündliche und allergische Erkrankungen bietet das Fraunhofer ITEM Forschungs- und Entwicklungsarbeiten vom Molekül bis hin zur klinischen Prüfung an. Mit zell- und molekularbiologischen Methoden werden neue Zielstrukturen für Diagnostik und Therapie validiert und in der frühen Entwick-

lung optimiert. Sind mögliche Arzneimittelkandidaten erkannt, werden Wirksamkeit und Sicherheit getestet. Für die Zulassung von Medikamenten führt das Fraunhofer ITEM toxikologische und sicherheitspharmakologische Prüfungen unter Einhaltung der GLP-Richtlinien (»Good Laboratory Practice«) durch. In der Pharmazeutischen Biotechnologie werden Herstellungsverfahren für biopharmazeutische Wirkstoffe entwickelt. Für klinische Prüfungen mit Biopharmazeutika stellen wir die Prüfsubstanz nach GMP-Richtlinien (»Good Manufacturing Practice«) her. Auch Infusionslösungen werden aseptisch in einer GMP-Einheit abgefüllt.

Klinische Studien

Für die Zulassung von Arzneimitteln für die Indikationen Allergie, Asthma und COPD (bekannt als Raucherhusten) führt das Fraunhofer ITEM unter der Leitung von Fachärzten klinische Studien nach GCP-Richtlinien (»Good Clinical Practice«) durch, vor allem Studien der Phasen I und II. Als besondere Ausstattung stehen dafür verschiedene Expositionsräume zur Verfügung. In der so genannten Fraunhofer Environmental Challenge Chamber, die bisher für die Exposition mit Gräserpollen und mit Hausstaub-Allergenen genutzt wird, können zukünftig auch andere Allergene getestet werden.

Tumore individuell therapieren

Mit der personalisierten Tumorthherapie befasst sich die gleichnamige Fraunhofer-Projektgruppe, die seit 2011 an der Universität Regensburg aktiv ist. Schwerpunkt ist die anwendungsorientierte Grundlagenforschung über die Bildung von Metastasen und die Umsetzung der Ergebnisse in neue diagnostische Verfahren und therapeutische Produkte.



Themen im Überblick

DIAGNOSE UND THERAPIE

Medikamente und Diagnostika prüfen und entwickeln

- Pharmakologische und toxikologische Forschung und GXP-Studien
- Klinische Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der entzündlichen und allergischen Erkrankungen der Atemwege

PRÄVENTION

Potenzielle Schadstoffe analysieren und bewerten

- Toxikologische Untersuchungen, Gefährdungsbeurteilung und Risikoabschätzung; insbesondere von inhalierbaren Schadstoffen
- Prüfung und Registrierung von Chemikalien, Bioziden und Pflanzenschutzmitteln

MECHANISTISCHE UNTERSUCHUNGEN

- Pathogenese von Erkrankungen
- Exogene und endogene Wirkstoffe

Potenzielle Schadstoffe bewerten

Ob am Arbeitsplatz, in der Umwelt oder in Verbraucherprodukten – wir weisen Schadstoffe nach und prüfen, inwieweit der Mensch exponiert wird. Komplexe Atmosphären können im Labormaßstab nachgestellt werden. Am Fraunhofer ITEM werden alle Untersuchungen angeboten: vom Nachweis der luftgetragenen Schadstoffe bis hin zur Herstellung geeigneter Testaerosole für In-vivo- und In-vitro-Studien. Für eine verlässliche Beurteilung der Gefährdung werden inhalations- und allgemeintoxikologische Untersuchungen durchgeführt: an Zellen, Geweben und Organismen.

Chemikalien prüfen und registrieren

Auf der Grundlage von eigenen experimentellen Studien, von Literaturrecherchen und von Daten der Auftraggeber erstellen unsere Wissenschaftler Berichte über Prüfsubstanzen und führen bei Bedarf Expositions- und Risikoabschätzungen für den Menschen durch. Außerdem unterstützt das Institut die Kunden bei der Registrierung von Chemikalien und komplexen Gemischen und bei der Bewertung von Stoffen, die der europäischen Chemikalienverordnung REACH unterliegen.

Qualität auf höchstem Niveau sichern

Die Abteilung Qualitätssicherung ist verantwortlich dafür, dass die Studien im Institut auf konstant hohem Niveau entsprechend den GXP-Regularien durchgeführt werden. Sie überwacht als zentrale Einrichtung des Instituts die Umsetzung der gesetzlich geforderten Qualitätssicherungssysteme GLP, GMP und GCP, die gewährleisten, dass die Prozesse bei der Herstellung und Entwicklung von Arzneimitteln und der Sicherheitsprüfung von Chemikalien zuverlässig und nachvollziehbar durchgeführt werden und die erhobenen Daten valide sind.

Expertise in der Mess- und Verfahrenstechnik:

Inhalierbare Aerosole für die Wirkungsforschung

Für Inhalationsstudien sind das umfassende Fachwissen und die langjährige Erfahrung der Aerosoltechnologen am Fraunhofer ITEM eine wesentliche Voraussetzung. Das Know-how über die Aerosolisierung von Substanzen sowie über die Deposition und Kinetik von inhalierten Stoffen wird auch für die Entwicklung von Arzneimittelaerosolen genutzt.

Know-how kombinieren

Das Fraunhofer ITEM kooperiert mit Partnerinstituten innerhalb der Fraunhofer-Gesellschaft und kombiniert das eigene Know-how mit dem externer Kooperationspartner. Dadurch wird das Leistungsangebot noch umfassender. Wichtige Partner in der unmittelbaren räumlichen Nähe des Instituts sind z. B. die Medizinische Hochschule Hannover (MHH), das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig und das Twincore.

Gemeinsam mit der MHH und dem HZI gründet das Fraunhofer ITEM ein neues klinisches Studienzentrum, das »Clinical Research Center Hannover« (CRC Hannover). Der erste Spatenstich wurde im Mai 2011 gefeiert. Bereits im Herbst 2013 sollen noch nicht

zugelassene Medikamente auf ihre Sicherheit und Wirksamkeit in klinischen Probandenstudien untersucht werden. Das CRC Hannover wird eine optimale Infrastruktur für frühe klinische Studien (Phasen I und II) bieten und die Basis für eine enge Verzahnung von Grundlagenforschung und klinischer Forschung schaffen. Das neue Studienzentrum ist eingebunden in die medizinische Translationsallianz in Niedersachsen (TRAIN). TRAIN ist ein vom Niedersächsischen Ministerium für Wissenschaft und Kultur geförderter interdisziplinärer Verbund von universitären und außeruniversitären Instituten in Niedersachsen mit dem Ziel, neue Medikamente und Impfstoffe zu entwickeln und mit möglichst reduziertem Kosten- und Zeitaufwand aus dem Labor zum Patienten zu bringen.

Die am Institut vorhandenen Kompetenzen sind in vier Geschäftsfeldern gebündelt:

1. Pharmaforschung, Pharmaentwicklung und Medizinische Biotechnologie
2. Klinische Atemwegsforschung
3. Gewerbe-, Umwelttoxikologie und Verbraucherschutz
4. Prüfung und Registrierung von Chemikalien, Bioziden und Pflanzenschutzmitteln



ZUKUNFTSFELDER

Zum Erfolgskonzept des Fraunhofer ITEM gehört es, technologische Trends und aktuelle Marktentwicklungen zu erkennen und das Dienstleistungsangebot entsprechend anzupassen. Von der Vorlaufforschung, den daraus gewonnenen wissenschaftlichen Erkenntnissen und innovativen Technologien profitieren die Kunden des Fraunhofer ITEM ebenso wie von den weiterführenden Projekten und vertiefenden Studien. Daher wurden die folgenden Arbeitsgebiete und Kompetenzen etabliert bzw. weiter ausgebaut:

Toxikologie

- Entwicklung eines Aerosolgenerators für Kohlenstoffnanoröhren (CNT) zur Durchführung von Inhalationsversuchen
- Verfahrensentwicklung zur automatisierten, spezifischen Detektion und Quantifizierung biogener Luftschadstoffe
- Entwicklung von validierten In-vitro-Screening-Tests zur Frage des Gefährdungspotenzials von Nanopartikeln
- Aufbau von Techniken zur gezielten elektronenmikroskopischen Untersuchung von pathologischen Veränderungen und von Nanopartikeln aus histologischen Schnittpräparaten
- Immunologische und histopathologische Untersuchungen von humanem Probenmaterial aus dem Respirationstrakt
- Entwicklung von intelligenten Teststrategien für die Chemikalienbewertung
- Entwicklung von adäquaten toxikologischen und pharmakologischen Testsystemen für die Zulassung von Biopharmaka gemäß den Anforderungen der Europäischen Arzneimittelagentur EMA
- Aufbau von toxikologischen Datenbanken
- Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen in der Toxikologie (QSAR)
- Entwicklung von Konzepten für die Risikobewertung von Stoffgruppen im Rahmen der Registrierung von Chemikalien für die neue europäische Chemikalienverordnung REACH

Pharmakologie

- In-vitro-Prüfungen (Screening) von luftgetragenen Aerosolen, einschließlich Medikamentenkandidaten
- Weiterentwicklung von Ex-vivo-Methoden (»Precision-cut lung slices«, PCLS) zur Untersuchung von Substanzeffekten auf die Lunge von verschiedenen Tierspezies und vom Menschen (u. a. zur Bestimmung des allergenen Potenzials von Chemikalien und Pharmaka)
- Entwicklung von Lungenentzündungsmodellen am nicht-menschlichen Primaten (in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Primatenzentrum in Göttingen)
- Weiterentwicklung von Tiermodellen für chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Asthma und Lungeninfektionen für die Arzneimittelentwicklung
- Erzeugung von Expositions-Atmosphären mit unterschiedlichen Allergenen für klinische Prüfungen der spezifischen Immuntherapie im Fraunhofer-Provokationsraum
- Auffindung neuer Biomarker in der Ausatemluft zur Diagnostik und Therapieüberwachung von Atemwegserkrankungen
- Entwicklung neuer Biomarker (ncRNA) für chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen
- Bildgebende Verfahren (MRT, CT und PET) in der klinischen Wirkungsforschung
- Aerosole in der Medizintechnik: Entwicklung und Qualifizierung innovativer Inhalationstechnologien
- Nutzung von Nanopartikeln für therapeutische Zwecke, z. B. als Vehikel von therapeutischen Antikörpern
- Entwicklung und Validierung von robusten Plattformtechnologien zur Herstellung von biopharmazeutischen Wirkstoffen auf Basis von rekombinanten Antikörpern und Nukleinsäuren

KURATORIUM

Die Kuratorien der einzelnen Fraunhofer-Institute stehen der Institutsleitung beratend zur Seite. Ihnen gehören Personen aus Wissenschaft, Wirtschaft und der öffentlichen Hand an. Mitglieder des Kuratoriums des Fraunhofer ITEM waren im Jahr 2011:

Dr. Eckhard von Keutz

Kuratoriumsvorsitzender
Senior Vice President, Global Head Early Development,
Bayer HealthCare AG

Professor Dr. Dieter Bitter-Suermann

Stellvertretender Kuratoriumsvorsitzender
Präsident und Präsidiumsmitglied für das Ressort Forschung
und Lehre der Medizinischen Hochschule Hannover

Professor Dr. Helmut Blome

Direktor, Institut für Arbeitsschutz der Deutschen
Gesetzlichen Unfallversicherung

Dr. Ulrich Deschl

Leiter Nichtklinische Arzneimittelsicherheit,
Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG

Professor Dr. Paul-Georg Germann

Senior Vice President, Nycomed GmbH

Professor Dr. Thomas Jung

Translational Medicine Head European Union,
Novartis Pharma AG

Dr. Günther Karmann

Geschäftsführer, Karmann Consulting GmbH

Dr. Martin Kayser

Senior Vice President, Head of the Department of
Product Safety, Regulations, Toxicology and Ecology, BASF AG

Professor Dr. Hillel S. Koren

Managing Director, Environmental Health, LLC,
ehemals Director Human Studies Division,
United States Environmental Protection Agency,
Research Professor Carolina Environmental Program,
The University of Carolina at Chapel Hill, USA

Professor Dr. Reinhard Pabst

Niedersachsen-Seniorforschungsprofessor
für Immunmorphologie,
Medizinische Hochschule Hannover

Professor Dr. Klaus F. Rabe

Chefarzt Pneumologie, Ärztlicher Direktor und
Medizinischer Geschäftsführer, Krankenhaus Großhansdorf;
Innere Medizin – Pneumologie, Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

Professor Dr. Gerhard Schlüter

Consultant in Toxicology,
ehemals Global Head Toxicology, Bayer HealthCare AG

Ministerialrat Dr. Hans Schroeder

Leiter Referat Wissenschaft und Wirtschaft, EU-Strukturfonds,
Niedersächsisches Ministerium für Wissenschaft und Kultur

Dr. Thor A. Voigt

Head of Global Clinical Operations, Biometrics &
Data Management,
Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG

PERSONAL UND BETRIEBSHAUSHALT

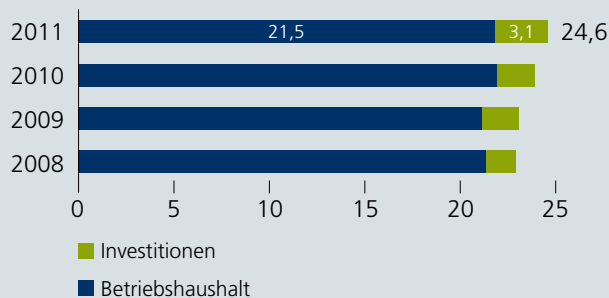
Am Jahresende 2011 waren am Fraunhofer ITEM 263 Personen tätig. Das Personal gliedert sich nach verschiedenen Beschäftigungsgruppen wie folgt:

- 91 Wissenschaftler
- 69 graduierte Mitarbeiter
- 79 technische Mitarbeiter
- 4 Doktoranden
- 3 wissenschaftliche Hilfskräfte
- 5 sonstige Hilfskräfte
- 12 Auszubildende

Der Betriebshaushalt hat im Jahr 2011 ein Volumen von 21,5 Millionen Euro* erreicht. Dabei belief sich die Finanzierung aus selbst erwirtschafteten Mitteln auf 72 Prozent. Der Anteil der Industrieerträge am Betriebshaushalt betrug etwa 34 Prozent – auf den Standort Hannover bezogen betrug er etwa 42 Prozent. Die Investitionen des Fraunhofer ITEM beliefen sich auf rund 3,1 Millionen Euro.

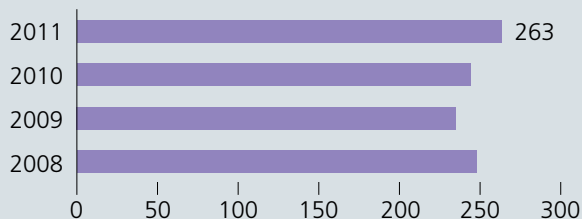
Gesamthaushalt des Fraunhofer ITEM

In Mio €



Das Personal des Fraunhofer ITEM

Anzahl der Mitarbeiter



Auftraggeber und externe Erträge des Fraunhofer ITEM

In Mio €



* vorläufige Zahlen zum Zeitpunkt der Drucklegung

ORGANIGRAMM FRAUNHOFER ITEM

Qualitätssicherung: Dr. I. Fleischhauer

Verwaltung: S. Reichert

Informationstechnologie: Dr. G. Spiekermann

Haustechnik: L. Illichmann

Bibliothek: C. Jürgens

Marketing/PR: Dr. F. Drenk, Dr. C. Nastevska, K. Neubert

INSTITUTSLEITUNG

Prof. Dr. Dr. U. Heinrich (geschäftsführend)

Prof. Dr. N. Krug

FÜHRUNGSKONFERENZ

Institutsleitung und Bereichsleitung

Toxikologie und Umwelthygiene

Prof. Dr. C. Dasenbrock

Atemwegsforschung

Prof. Dr. J. Hohlfeld

Pharmazeutische Biotechnologie

Dr. H. Ziehr

Inhalationstoxikologie

Dr. O. Creutzenberg

Dr. B. Bellmann

Klinische Atemwegsforschung

Prof. Dr. J. Hohlfeld

Dr. P. Badorrek

Qualitätskontrolle

Dr. L. Baydoun

Dr. I. Oltmann-Norden

Regulatorische und Allgemeine Toxikologie

Dr. R. Fuhst

Klinische Methodenentwicklung

Dr. O. Holz

Zellkulturtechnik

Dr. V. Hecht

Dr. S. Duvar

Reproduktionstoxikologie

Dr. J. Buschmann

Klinische Pharmakologie

Prof. Dr. J. Frölich

Mikrobielle Kultivierung

Dr. A. Ross

Dr. K. Bohle

Klinische Chemie und ADME

Dr. T. Hansen

Atemwegsimmunologie

Prof. Dr. A. Braun

Aufarbeitungstechnik

Dr. J. Paulsen

Dr. C. Lürer

Pathologie

Priv.-Doz. Dr. S. Rittinghausen

Biomarker und Infektion

Dr. M. Müller

Aseptische Abfüllung

Dr. H. Ziehr

G. Böckenholt

Genetische und In-vitro-Toxikologie

Dr. C. Ziemann, Dr. J. Knebel

Atemwegspharmakologie

Dr. H.-G. Hoymann

Mechanistische Toxikologie

Dr. R. Halter

Dr. M. Niehof

Immunpharmakologie und Immuntoxikologie

Dr. K. Sewald

Tierhaus

Dr. T. Tillmann

Chemikalienbewertung, Datenbanken und Expertensysteme
Dr. I. Mangelsdorf

Chemikalien/REACH
Dr. G. Könnecker
Dr. O. Licht

Biozide
Dr. A. Bitsch
Dr. S. Hahn

Tierarzneimittel
Dr. A. Wibbertmann
Dr. T. Hahn

Internationales Programm der WHO zur Chemikaliensicherheit
Dr. I. Mangelsdorf

Teststrategien und Struktur-Wirkungsbeziehungen
Dr. S. Escher, Dr. M. Batke

Datenbanken und Informationssysteme
Dr. R. Kellner

Nanopartikel
Dr. I. Mangelsdorf, Dr. K. Schröder

Aerosolforschung und Analytische Chemie
Prof. Dr. W. Koch

Aerosoltechnologie
Prof. Dr. W. Koch

Inhalationstechnologie
Dr. G. Pohlmann

Bio- und Umweltanalytik
Dr. S. Schuchardt
Dr. E. Berger-Preiß

Strukturanalytik
Dr. S. Schuchardt

Sie finden hier die Ansprechpartner für einzelne Bereiche, Abteilungen und Kompetenzen auf einen Blick. Der Bereich Pharmazeutische Biotechnologie hat seinen Hauptsitz in Braunschweig, ist aber auch für die GMP-Abfüllanlage im Fraunhofer-Institut in Hannover zuständig. Die Fraunhofer-Projektgruppe hat ihren Sitz im BioPark Regensburg und ist aufgrund einer gemeinsamen Initiative des Fraunhofer ITEM, der Fraunhofer-Gesellschaft und der Universität Regensburg entstanden. Zurzeit ist das Institut in vier Geschäftsfeldern tätig, die wir Ihnen zusammen mit ausgewählten Projekten im zweiten Teil des Jahresberichts vorstellen werden.

MELDUNGEN 2011

Spatenstich für das neue Zentrum für frühe klinische Studien

Am 5. Mai 2011 erfolgte der erste Spatenstich für das neue Clinical Research Center Hannover (CRC Hannover), das auf dem Gelände des Fraunhofer ITEM gebaut wird. »Das neue Studienzentrum wird es möglich machen, dass Forschungsergebnisse zügig in neue Medikamente und Diagnosemethoden überführt werden können«, ist sich der geschäftsführende Institutsleiter Professor Uwe Heinrich sicher. Das CRC Hannover entsteht in einer starken Partnerschaft mit der benachbarten Medizinischen Hochschule Hannover und dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung. Ab Herbst 2013 sollen dort neue, noch nicht zugelassene Medikamente auf Sicherheit (Phase-I-Studien) und Wirksamkeit (Phase-II-Studien) getestet werden. Dafür werden 60 Klinikbetten zur Verfügung stehen sowie die Infrastruktur für Forschung und Klinik.



Deutsches Zentrum für Lungenforschung hat seine Arbeit aufgenommen

Das Fraunhofer ITEM ist beteiligt am Deutschen Zentrum für Lungenforschung (DZL). Der neue deutschlandweite Verbund von sechs exzellenten Universitäten und außer-universitären Forschungseinrichtungen ist 2011 an den Start gegangen. Neben Hannover sind Institute an vier weiteren Standorten in Deutschland beteiligt. Ihr Ziel ist es, möglichst schnell effektive Therapien insbesondere für chronische Erkrankungen der Lunge zu entwickeln. Das Fraunhofer ITEM ist vor allem an den Forschungen zu Asthma und Allergien sowie zur chronischen Bronchitis (COPD) beteiligt. Auf diesen Gebieten bringt das Institut jahrelange Erfahrung in Forschung und klinischen Studien ein.



DZL
Deutsches Zentrum
für Lungenforschung

Patentiert: System für In-vitro-Tests

Eine neue Technik macht es möglich, die Reaktion von Lungenzellen auf luftgetragene Substanzen – Schadstoffe oder auch Pharmaka – live zu beobachten. Das am Fraunhofer ITEM entwickelte Kultur- und Expositionssystem P.R.I.T.[®]-ALI hat 2011 sein Patent erhalten. Mit dem neuen System können die Wissenschaftler verschiedene



Zellen des Respirationstrakts und auch Gewebekulturen auf normierten, laborgängigen Kulturplatten kultivieren, sie dann an der Luft-Flüssigkeitsgrenze gegenüber Testatmosphären

exponieren und dabei die biologischen Effekte analysieren – und das bereits während der Behandlung der Zellen. Ein solches Online-Monitoring eröffnet neue Möglichkeiten, um biologische Wirkungen von Stoffen zu erkennen.

Ausgezeichnet mit der Fraunhofer-Medaille

Am 31. März 2011 feierten rund 200 Gäste aus Wissenschaft, Politik und Wirtschaft das zehnjährige Bestehen und die hervorragende Entwicklung des Fraunhofer-Verbunds Life Sciences. Für Gründung, Aufbau und erfolgreiche Leitung des Verbunds, der die Life Sciences unter der Dachmarke Fraunhofer zu nationaler und internationaler Anerkennung geführt hat, wurde Professor Uwe Heinrich vom Vorstand der Fraunhofer-Gesellschaft mit der Fraunhofer-Medaille ausgezeichnet. Forschungsvorstand Professor Ulrich Buller überreichte die Medaille mit lobenden Worten: »Professor Heinrich hat den Verbund so vertreten, wie wir uns das im Vorstand vorstellen.« Der Life-Science-Verbund, der als jüngster und kleinster Verbund begann, umfasst inzwischen 1200 Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter aus sechs Fraunhofer-Instituten.



»Nobelpreis der Krebsforschung«

Professor Dr. Christoph Klein hat 2011 den renommierten Dr.-Josef-Steiner-Preis erhalten, der auch als »Nobelpreis der Krebsforschung« bezeichnet wird. Ausgezeichnet wurden seine grundlegenden Forschungsarbeiten über die Streuung von Krebszellen und die Entstehung von Metastasen. Professor Klein leitet die 2011 neu gegründete Fraunhofer-Projektgruppe »Personalisierte Tumorthherapie« in Regensburg, die an das Fraunhofer ITEM in Hannover angegliedert ist.



Bücherflohmarkt für den guten Zweck

Wie in jedem Jahr war auch 2011 kurz vor Weihnachten fast der stärkste Besucherandrang in der Institutsbibliothek zu verzeichnen. Der Grund war der bewährte Bücherflohmarkt, bei dem sich Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter von ausgelesenen Büchern trennen, um sie – gegen eine kleine Spende – gegen neue ausgelesene Bücher der Kollegen zu tauschen. Der Gesamterlös ging an das Straßenmagazin Asphalt, das Obdachlose in der Region unterstützt. Die Leselust der ITEM-Mitarbeiter hat 485 Euro eingebracht.

Braunschweig: Pharmazeutische Biotechnologie in neuem Gebäude

Die pharmazeutischen Biotechnologen des Fraunhofer ITEM freuen sich über neue Räume auf dem Campus des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung in Braunschweig. Endlich kurze Wege für die etwa 50 Mitarbeiter, die bisher auf vier Gebäude verteilt waren. Neben einer 700-Quadratmeter-Etage mit Büro- und Besprechungsfläche stehen nun auf zweieinhalb Etagen insgesamt etwa 2000 m² Labor- und Technikumsfläche für Verfahrensentwicklung und -Scale-up zur Verfügung sowie 600 m² Reinraumfläche der Klasse D und C für die GMP-Herstellung von biopharmazeutischen Wirkstoffen mit Mikroor-



ganismen und tierischen Zellen. Darüber hinaus wurde der bestehende Reinraumbereich um einen Reinraum der Klasse B erweitert, in dem Prüfärzneimittel nun steril hergestellt und in Vials und Ampullen abgefüllt werden.



PHARMAFORSCHUNG, PHARMAENTWICKLUNG UND MEDIZINISCHE BIOTECHNOLOGIE

Projektberichte

Biopharmazeutika mit alternativen, zeitsparenden
Verfahren herstellen

Epigenetische Mechanismen in Lungenkrebszellen

COPD: Zellkulturmodell für die Testung von
Arzneimitteln

Fraunhofer-Projekt »Aeskulap«: Forscher entwi-
ckeln schnelle und sichere Sepsis-Diagnostik

Projektübersicht



Mit den Kompetenzen dieses Geschäftsfelds unterstützen wir unsere Kunden in allen Phasen der Medikamentenentwicklung: von der Wirkstoffsuche und -optimierung über die präklinische Selektion und Testung von Wirkstoffen bis hin zur klinischen Prüfung (siehe Geschäftsfeld Klinische Atemwegsforschung, Seite 34). Außerdem ist in diesem Geschäftsfeld die biotechnische Herstellung von Biopharmazeutika angesiedelt.

Umfangreiche In-vitro-Testverfahren können sowohl als Screening-System in einer frühen Phase der Arzneimittelentwicklung als auch zur Targetvalidierung und für Efficacy-Studien eingesetzt werden.

Die Auswahl der zellulären Prüfsysteme für individuelle Studien erfolgt nach Gesichtspunkten wie Spezies-, Organ- und Wirkstoff-Relevanz, Auswahl der zu analysierenden Endpunkte und anderen Vorgaben.

Im Rahmen der präklinischen Wirkstoffselektion werden gemäß internationalen Richtlinien (OECD, EMA, FDA) Standardtests zur Gentoxizität sowie In-vitro-Untersuchungen zu ADME (z. B. CYP-Profilung, -Inhibition und -Induktion) durchgeführt. Um unerwünschte Nebenwirkungen von pharmakologisch wirksamen Substanzen bereits in einem frühen Stadium der Medikamentenentwicklung zu entdecken und mechanistisch zu erklären, steht eine Vielzahl von molekularbiologischen und biochemischen Techniken zur Verfügung.

Die Sicherheitsstudien für Biopharmaka, z. B. humanrekombinante Antikörper, benötigen besondere Testsysteme, um unerwünschte immunologische Effekte vor der erstmaligen Anwendung am Menschen zu erkennen und mit möglichst großer Sicherheit auszuschließen. Hierzu werden am Fraunhofer ITEM experimentelle Ansätze entwickelt, die eventuelle immunologische Reaktionen des menschlichen Organismus möglichst gut wiedergeben. Der Einsatz von vitalen Lungenschnitten ermöglicht beispielsweise den Speziesvergleich über den Affen bis hin zum Menschen.



Für Arzneimittelprüfungen und andere Fragestellungen sind In-vivo-Studien weiterhin unerlässlich und gesetzlich vorgeschrieben. Das Fraunhofer ITEM bietet dazu folgende Untersuchungen an:

- Toxizitätsstudien an Nagern und Nichtnagern
- Toxizitätsstudien an Jungtieren (juvenile Toxikologie)
- Toxiko- und Pharmakokinetikstudien
- Untersuchungen zur Erkennung subchronisch- und chronisch-toxischer Effekte
- Identifizierung kanzerogener, teratogener oder mutagener Effekte
- sicherheitspharmakologische Studien
- Einsatz bildgebender Verfahren, wie Mikro-Computertomographie und optische Bildgebung, um den Therapieerfolg neuer Pharmazeutika zu dokumentieren
- transgene Mausmodelle (Adenokarzinome der Lunge und Leber) und Maus-Infektionsmodelle zur Targetvalidierung und für Efficacy-Studien
- Untersuchungen an Asthma-, Allergie-, Entzündungs- und Infektionsmodellen
- Studien zur Erfassung der Lungenfunktionsparameter bei Nagern (invasiv und nicht-invasiv)

Sowohl die In-vitro- als auch die In-vivo-Studien werden nach geltenden GLP-Richtlinien durchgeführt. Ergänzend zu experimentellen Untersuchungen bietet das Fraunhofer ITEM seinen Kunden außerdem Unterstützung bei der Beantragung der Zulassung von Arzneimitteln an, einschließlich der notwendigen Dokumentation.

Auf dem Gebiet der Biotechnologie entwickelt und validiert das Fraunhofer ITEM Herstellungsverfahren für biopharmazeutische Wirkstoffe. Diese können bei Bedarf für präklinische und klinische Prüfungen entsprechend dem GMP-Qualitätsstandard hergestellt werden. Das Wirkungsspektrum umfasst Proteine, Glykoproteine, Antikörper, Nukleinsäuren, Virus-Like-Particles und Bakteriophagen. Eine große Nachfrage besteht bereits für therapeutische Antikörper und wird künftig auch für Nukleinsäuren erwartet. Für die GMP-Herstellung dieser beiden Substanzklassen entwickelt das Fraunhofer ITEM robuste Technologieplattformen.

KONTAKT



Dr. med. vet. Rainer Fuhst
Telefon +49 511 5350-454
rainer.fuhst@item.fraunhofer.de



Dr. Monika Niehof
Telefon +49 511 5350-570
monika.niehof@item.fraunhofer.de



Dr. Holger Ziehr
Telefon +49 531 6181-6000
holger.ziehr@item.fraunhofer.de

Projektbericht

BIOPHARMAZEUTIKA MIT ALTERNATIVEN, ZEITSPARENDEN VERFAHREN HERSTELLEN

ZUSAMMENFASSUNG

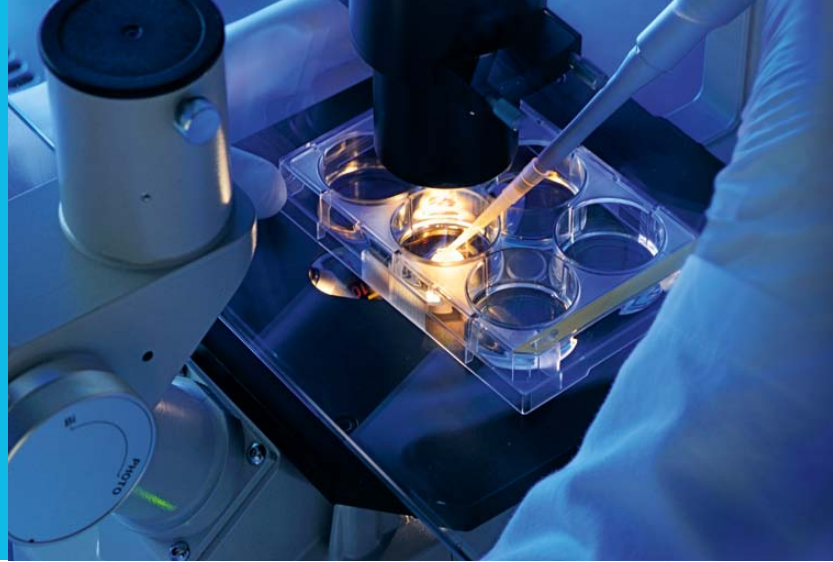
Die pharmazeutische Industrie unterliegt strikten Kosten- und Zeitvorgaben, um neue Biopharmazeutika zur Zulassung zu bringen. Diese entscheiden oft über den Erfolg eines Projekts. Die klassischen Methoden zur Herstellung von Produktionszelllinien basieren auf der zufälligen Integration des Zielgens in das Genom. Dieses Verfahren ist sehr zeitintensiv, es kann bis zu 18 Monate dauern. Um die Zeit für die Zelllinienentwicklung zu verkürzen, haben Wissenschaftler des Bereichs Pharmazeutische Biotechnologie am Fraunhofer ITEM eine alternative Strategie entwickelt. Sie nutzen einen gezielten Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch (RMCE), mit dem sie innerhalb von sechs Wochen eine robust und stabil produzierende Produktionszelllinie erhalten.

Der prozentuale Anteil der biopharmazeutischen Wirkstoffe in Arzneimitteln nimmt kontinuierlich zu. Zu diesen gehören komplex glykosylierte Proteine wie EPO und in den letzten Jahren in zunehmenden Maße rekombinante Antikörper.

Für die stabile Produktion von Glykoproteinen wird heute fast ausschließlich die Säugerzelllinie CHO (**C**hinese **H**amster **O**vary) verwendet. Für die Wirtschaftlichkeit eines Herstellungsprozesses steht das Erreichen einer hohen, vorhersagbaren, spezifischen und stabilen Expression der rekombinanten Zielproteine im Vordergrund. Dabei ist die Produktivität einer Zelle unter anderem abhängig vom Vektorkonstrukt und dem Gen, das man einbringen möchte, dem so genannten »Gene of interest« (GOI). Auch die Anzahl der Integrate sowie die Integrationsstelle (Locus) des Transgens spielen eine Rolle.

Konventionelle Methode – zufällige Genintegration

Konventionelle Methoden zur Entwicklung von stabilen Zelllinien beruhen häufig auf der zufälligen Integration des GOI in das Genom der Zelle. Daraus resultieren unterschiedliche Expressionsverhalten der einzelnen Klone. Der Integrationsort und seine Umgebung sowie die Anzahl der Integrate beeinflussen allerdings maßgeblich die Stabilität und Höhe der Expression. Deshalb ist die Etablierung von Produktionszelllinien mit guten Produktionseigenschaften häufig mit einer zeit- und arbeitsintensiven Suche nach einem geeigneten Zellklon verbunden. Der Nachteil des klassischen Verfahrens zur Zelllinienentwicklung ist, dass das Screening nach einem hoch exprimierenden Klon für jedes neue Protein wiederholt werden



muss und das Ergebnis aufgrund der Zufallsintegration weder vorhersagbar noch standardisierbar ist.

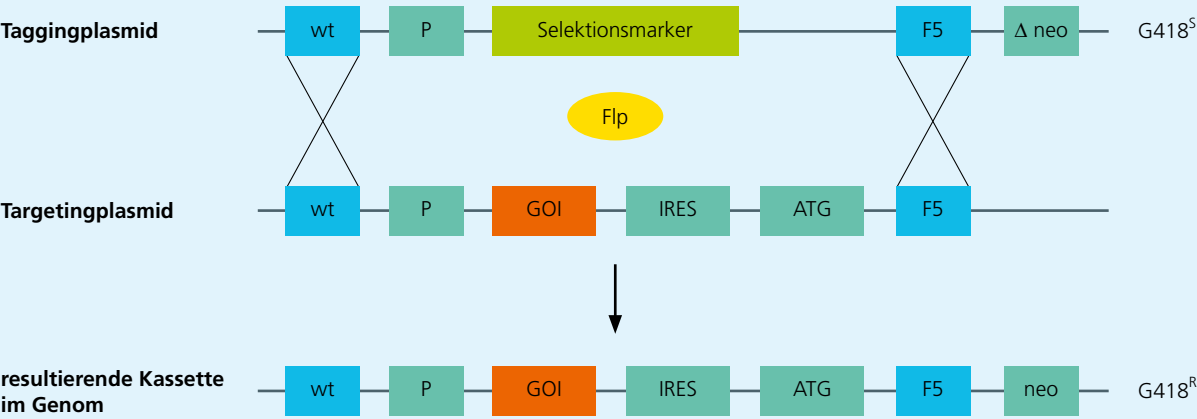
Um nicht für jedes neue Protein eine Zelllinie mit spezifischen Eigenschaften erzeugen zu müssen, haben die Wissenschaftler einen neuen, vielversprechenden Weg eingeschlagen: Das GOI soll gezielt und auch austauschbar in einem transkriptionell aktiven chromosomalen Locus integriert werden. Diese Strategie hat den enormen Vorteil, eine Einzelkopie jedes GOI in die gleiche chromosomale Umgebung zu bringen, was folglich zu einer vergleichbaren Expressionshöhe und einer hohen Reproduzierbarkeit führt. Zudem reduziert sich der Zeitaufwand zur Etablierung einer neuen Produktionszelllinie von etwa 70 Wochen auf nur sechs Wochen.

Neue Methode – gezielter Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch

Die gezielte Integration eines Transgens in einen bekannten genomischen Locus wird über einen Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch (RMCE) erreicht. Hierbei wird die Eigenschaft einer F₁p-Rekombinase genutzt, an spezifische Erkennungssequenzen, die FRT-Bindungsstellen, zu binden und einen DNA-Austausch zwischen homologen FRT-Sequenzen herbeizuführen. Für den RMCE wurden die FRT-Sequenzen so modifiziert, dass nur identische Erkennungssequenzen effizient rekombinieren, während FRT-Stellen mit unterschiedlicher Sequenz nicht oder mit geringer Effizienz rekombinieren. Diese RMCE-Technik basiert auf zwei Schritten, dem Tagging und dem

Abb. 1: Prinzip des Rekombinase-vermittelten Kassettenaustauschs (RMCE).

Ein Taggingplasmid besitzt zwei unterschiedliche FRT-Erkennungsstellen: die Wildtyp-FRT-Sequenz und die mutierte F5-FRT-Sequenz. Ein Promotor (P) steuert die Transkription eines Markers. Dieser dient dazu, Zellen, die dieses Konstrukt tragen, screenen und selektieren zu können. Hinter der F5-FRT-Sequenz gibt es ein verkürztes Neomycin-Gen, so dass Zellen, die dieses Taggingplasmid tragen, empfindlich auf das Antibiotikum Neomycin (G418) reagieren. Zum Kassettenaustausch wird ein Targetingplasmid benötigt, das das einzubringende Gen (GOI) und die gleichen FRT-Sequenzen trägt wie das Taggingplasmid. Zudem wird über ein IRES-Element (Internal Ribosomal Entry Site) die Transkription des Neomycin-Gens gesteuert, dessen fehlendes Startcodon (ATG) mit auf dem Targetingplasmid liegt. Der Kassettenaustausch findet durch die F₁p-Rekombinase statt, die man exogen dazu gibt. Das resultierende Konstrukt in den Zellen enthält schließlich den Promotor, das GOI, das IRES-Element und ein vollständiges Neomycin-Gen, das zu einer Neomycin-Resistenz der so veränderten Zellen führt.



Targeting. Beim Tagging wird der genomische Locus markiert (getaggt). Hierbei werden zwei unterschiedliche und inkompatible FRT-Erkennungsstellen in Kombination mit einem Selektionsmarker im Genom inseriert. Anschließend wird an dem so markierten Locus ein Kassettenaustausch durchgeführt. Ein Zielvektor (Targetingplasmid) ersetzt die durch FRT-Sequenzen flankierte DNA-Region im markierten Locus. Diese Reaktion wird durch die FLP-Rekombinase katalysiert.

Der RMCE kann weiter verfeinert werden, indem eine verkürzte Version eines Selektionsmarkers im Taggingplasmid durch Austausch mit dem Zielplasmid komplettiert wird. Damit steht ein Selektionsverfahren zur Verfügung, das ein erfolgreiches Targeting signalisiert (Abb. 1).

Ergebnisse

Mit verschiedenen konzipierten Taggingplasmiden wurde nach stabil und hoch produzierenden Zellklonen gesucht, die nur ein Integrat aufwiesen. Es wurden Klone gefunden, die bis zu 7 pg eines rekombinanten Proteins pro Zelle und Tag exprimierten. Dies ist im Vergleich zu konventionellen Systemen zur Zelllinienentwicklung ein sehr guter Wert, zumal dieser mit nur einer Kopie im Genom erreicht wurde. Als Testsystem diente ein rekombinanter Antikörper der Maus (IgG2a). Damit konnten die Wissenschaftler zeigen, dass die Methode grundsätzlich in CHO-Zellen funktioniert.

Weitere Untersuchungen mit anderen rekombinanten Proteinen wie Interleukinen oder Kinasen sollen helfen, die Expressionseigenschaften vorherzusagen und schließlich Strategien zur Verbesserung der genomischen Loci und der Expressionslevel zu entwickeln.



KONTAKT

Dr. Nathalie Veith
Telefon +49 531 6181-6340
nathalie.veith@item.fraunhofer.de



Projektbericht

EPIGENETISCHE MECHANISMEN IN LUNGENKREBSZELLEN

ZUSAMMENFASSUNG

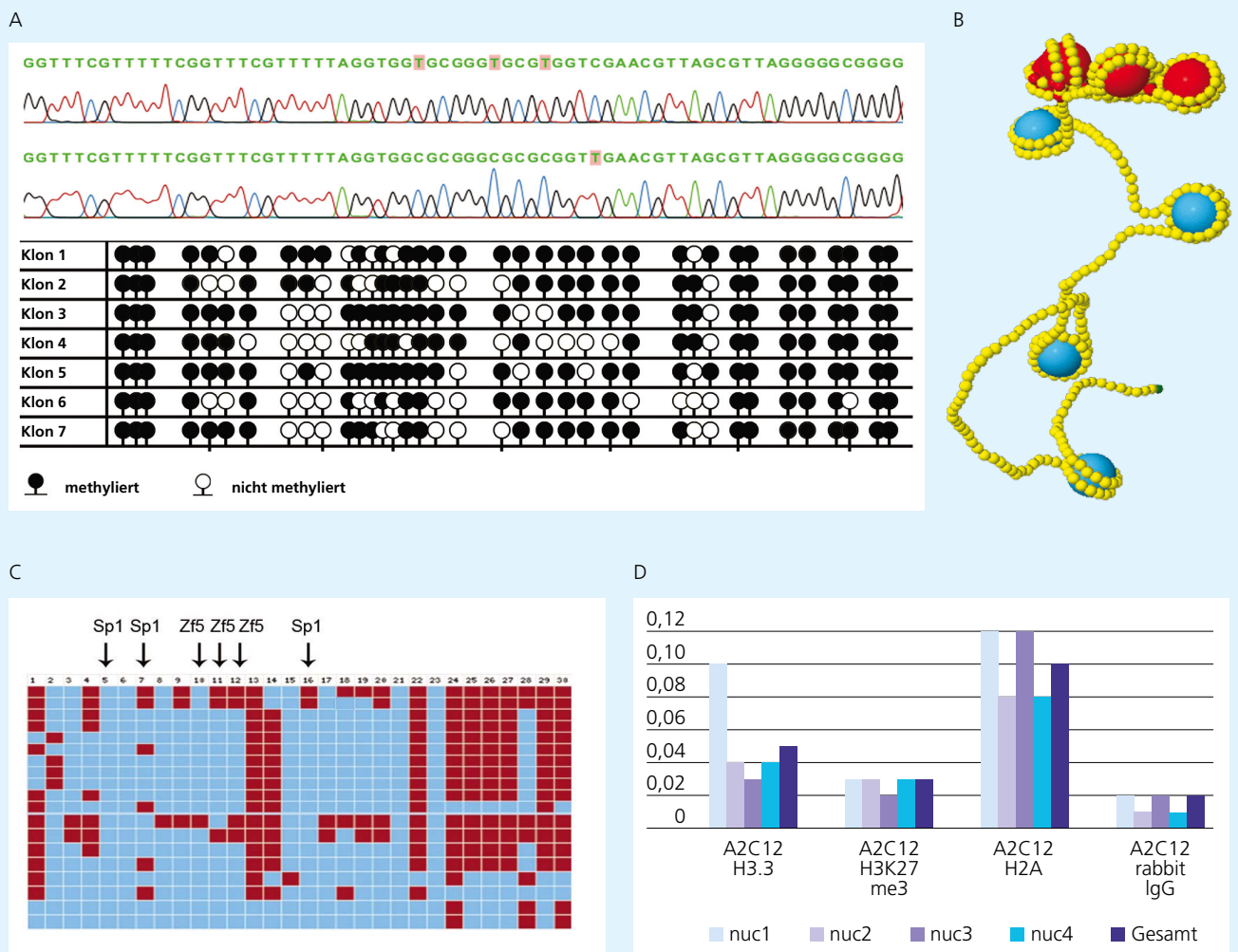
Bei der Entstehung von Krankheiten wie Krebs spielen neben genetischen Aberrationen auch epigenetische Veränderungen von Genen eine Rolle. Dabei ist das Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren, z. B. die Position von Nukleosomen, DNA-Methylierung oder Histonvarianten, äußerst komplex. Dieses komplexe Zusammenwirken zu verstehen beschäftigt Wissenschaftler am Fraunhofer ITEM. Sie haben eine Bandbreite an molekularen Methoden aufgebaut, mit denen sie genetische und auch epigenetische Mechanismen untersuchen können, die bei der Entstehung von Krankheiten oder nach Exposition gegenüber Umweltschadstoffen eine Rolle spielen.

Epigenetische Prozesse führen zu vererbaren Veränderungen in der Genexpression, die nicht auf einer Änderung der primären DNA-Sequenz beruhen. Sie sind wichtig für die normale Entwicklung und Differenzierung, doch kann es durch Fehlsteuerungen zur Ausbildung von Krankheiten kommen. Ein weithin bekanntes Phänomen bei Krebserkrankungen sind aberrante Methylierungen, die zum Abschalten von Genen führen. Im Gegensatz zu genetischen lassen sich epigenetische Veränderungen auch rückgängig machen. Die epigenetische Regulierung ist ein sehr komplexes Feld, in dem das Zusammenspiel wesentlicher Faktoren, wie z. B. Nukleosomenpositionierung, DNA-Methylierung, Histonvarianten, Histonmodifikationen und nichtkodierender RNA, von Bedeutung ist. Wie diese Faktoren zusammenwirken und dadurch die Genexpression beeinflussen, ist bisher nicht geklärt. Kenntnisse über die genauen epigenetischen Mechanismen sind daher wichtig für die Diagnose und Behandlung.

Unsere DNA ist in der Zelle in eine komplexe Kernproteinstruktur verpackt, die als Chromatin bezeichnet wird. Die sich wiederholenden Grundbausteine des Chromatins heißen Nukleosomen. Diese bestehen jeweils aus einem oktameren Histonkern, um den ein etwa 147 Basenpaare langes DNA-Fragment gewunden ist. Um die epigenetischen Mechanismen besser zu verstehen, insbesondere diejenigen, die sich darauf auswirken, wie das Chromatin bei Lungenkrebs gepackt wird, haben Wissenschaftler am Fraunhofer ITEM den Promotorbereich des Tumorsuppressorgens *Cadm1* in verschiedenen Vorläuferzelllinien von Lungenkrebs in der Maus untersucht (1). Schon früher konnten sie zeigen, dass es bei diesen Lungenkrebszelllinien

Abb. 1: Übersicht über epigenetische Veränderungen im Promotorbereich von *Cadm1* in Lungenkrebszellen der Maus.

- (A) Promotorhypermethylierung in verschiedenen Nachbildungen nach Bisulfit-Sequenzierung.
(B) Ermittelte Nukleosomenpositionen entlang des Promotorbereichs.
(C) Methylierungsmuster nach »single-molecule chromatin mapping« durch DNA-Methyltransferasen zur Identifizierung der Bindungsstellen von Nukleosomen.
(D) Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) zum Nachweis von Histonvarianten und Histonmodifikationen, die sich auf die Positionierung von Nukleosomen auswirken würden.



zu einer Hypermethylierung des *Cadm1*-Promotors kommt, die mit einer Repression der Transkription verbunden ist (2). Anders als in der gesunden Lunge entdeckten sie bei abgeschalteten Promotoren von Lungenkrebszellen, dass das Chromatin sehr fest verpackt war, wodurch die für die Genaktivierung erforderliche Remodellierung und Bindung von Proteinen verhindert wurde. Von noch größerer Bedeutung ist, dass bei Lungenkrebszellen nicht nur ein, sondern mehrere Schlüsselfaktoren gefunden wurden, die bei der Genabschaltung eine Rolle spielen. Hierbei kann es bei einzelnen Promotoren sowohl innerhalb derselben als auch zwischen verschiedenen Lungenkrebszelllinien zu Abweichungen kommen.

Die Wissenschaftler am Fraunhofer ITEM haben molekulare Methoden und das erforderliche Know-how zur Identifizierung sowohl genetischer als auch epigenetischer Mechanismen bei Krankheiten und nach Exposition gegenüber Umweltschadstoffen etabliert. Sie setzen unter anderem folgende Methoden ein:

- Nachweis von DNA-Polymorphismen, Mutationen und anderen genetischen Abweichungen durch Sequenzanalyse mittels Kapillarelektrophorese, denaturierende Hochleistungschromatografie (DHPLC) und PCR-RFLPs
- Identifizierung von abweichenden DNA-Methylierungsmustern durch mit Bisulfit behandelte genomische DNA, z. B. durch Bisulfit-Sequenzierung
- »Single-molecule-chromatin-mapping« durch DNA-Methyltransferasen zur Identifizierung der Bindungsstellen von Nukleosomen und Transkriptionsfaktoren
- Micrococcal-Nuclease (MNase)-Verdau mit anschließender Sequenzanalyse zur Bestimmung von Positionsveränderungen der Nukleosomen
- Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) von Histonvarianten und Histonmodifikationen zum Nachweis von Veränderungen der Nukleosomenstabilität und -position
- Versuche mit epigenetisch wirksamen Chemikalien wie 5-Aza-2'-Deoxycytidin, einem DNA-Methyltransferasehemmer

Literatur

- (1) Reamon-Buettner, S. M.; Borlak, J. (2011)
Dissecting epigenetic silencing complexity in the mouse lung cancer suppressor gene *Cadm1*. (zur Veröffentlichung eingereicht)
- (2) Reamon-Buettner, S. M.; Borlak, J. (2008)
Epigenetic silencing of cell adhesion molecule 1 in different cancer progenitor cells of transgenic c-Myc and c-Raf mouse lung tumors. *Cancer Res* 68: 7587-7596.



KONTAKT

Dr. Stella Marie Reamon-Büttner
Telefon +49 511 5350-527
stella.reamon-buettner@item.fraunhofer.de

Projektbericht

COPD: ZELLKULTURMODELL FÜR DIE TESTUNG VON ARZNEIMITTELN

ZUSAMMENFASSUNG

Für die chronisch obstruktive Bronchitis (COPD) wird derzeit noch nach einer geeigneten Therapie gesucht. Inhalativ verabreichte Medikamente, die direkt an den Wirkort gelangen, sind ein viel versprechender Ansatz. Für die effiziente Entwicklung solcher Medikamente werden In-vitro-Zellkultursysteme benötigt. Wissenschaftler am Fraunhofer ITEM haben ein Modell für das Bronchialepithel etabliert, bei dem sich die chronische Entzündungsreaktion, wie sie bei der COPD auftritt, simulieren lässt. Damit kann die Absorption von Arzneimitteln am menschlichen Bronchialepithel untersucht werden.

Hintergrund

Für viele Atemwegserkrankungen werden nach wie vor verbesserte und maßgeschneiderte Medikamente gesucht. So zum Beispiel für die chronisch obstruktive Bronchitis (COPD). Obwohl diese Erkrankung weit verbreitet ist, gibt es noch keine Therapie, die den Krankheitsverlauf stoppen kann. Ein viel versprechender Ansatz sind Medikamente, die inhalativ verabreicht werden und so direkt an den Wirkort gelangen. Um diese kostengünstig und schneller entwickeln zu können, werden In-vitro-Modelle benötigt, die die Atemwege und ihre Entzündungsprozesse nachahmen. Am Fraunhofer ITEM wurde ein solches Modell auf der Basis der humanen Bronchialepithelzelllinie Calu-3 entwickelt.

Die Calu-3-Zelllinie ist ein gut charakterisiertes Modell für das Epithel der unteren Luftwege und sie wird häufig eingesetzt, um Aufnahme und Transport von Arzneistoffen am Bronchialepithel zu untersuchen. Bei Patienten mit COPD allerdings könnte der chronische Entzündungsprozess, welcher diese Erkrankung auszeichnet, die Eigenschaften der Epithelzellen massiv verändern. Es war daher das Ziel dieses Projekts, ein Calu-3-basiertes Zellkulturmodell zu entwickeln, das den chronischen Entzündungsprozess des Bronchialepithels widerspiegelt. Darüber hinaus sollte auch der Einfluss von Surfactant auf die Absorption von Arzneistoffen untersucht werden.



Vorgehensweise

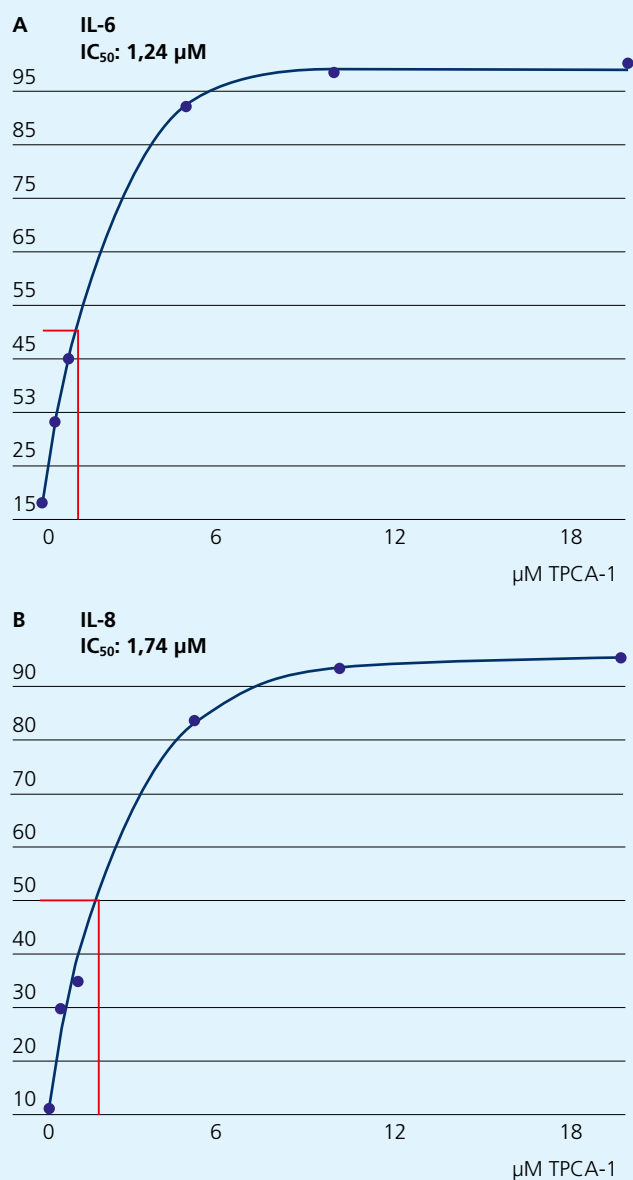
Calu-3-Zellen wurden auf permeablen Filtereinsätzen kultiviert, entweder an der Luft-Flüssigkeitsgrenze (Air Interfaced Culture, AIC) oder unter konventionellen Kulturbedingungen (Liquid Covered Culture, LCC). Die Integrität der Zell-Zellverbindungen (Tight-Junctions) wurde anhand des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) überprüft. Als zellspezifische Syntheseleistung wurde die Sekretion von Mucin im Kulturverlauf quantifiziert. Durch Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS) wurde in den Calu-3-Zellen eine Entzündungsantwort induziert, die über die Sekretion von IL-6 und IL-8 nachgewiesen wurde. Als antiinflammatorische Modellsubstanzen wurden drei verschiedene Signaltransduktionshemmer eingesetzt: SB 203580, ein p38 MAPK-Hemmer; TPCA-1, ein Hemmstoff der IKK-2-Kinase und damit des NF κ B-Signalwegs; AS252424, ein Phosphoinositid-3-Kinase-Hemmer. Die Signaltransduktionshemmer wurden in unterschiedlichen Konzentrationen zum apikalen Kompartiment der Zellkulturen hinzugegeben, um die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) zu bestimmen, die für die Hemmung der LPS-induzierten IL-6- und IL-8-Sekretion nötig ist.

Ergebnisse

Der TEER, ein Maß für die Dichtigkeit der Tight-Junctions, war während der gesamten Kultivierungsdauer (2 Wochen) höher unter LCC-Bedingungen. Die höchsten TEER-Werte wurden an Tag 11 beobachtet.

Die Sekretion von IL-6 war in unstimulierten Kulturen unter AIC-Bedingungen deutlich niedriger als die von IL-8, während AIC-Zellen zu allen Zeitpunkten signifikant mehr IL-8 produzierten als LCC-Zellen. Durch Zugabe von LPS konnte reproduzierbar ein dosisabhängiger Anstieg der IL-6- und der IL-8-Produktion induziert werden. Da dieser Effekt unter LCC-Bedingungen stärker ausgeprägt war, wurden die weiteren Experimente in LCC durchgeführt.

Abb. 1: Hemmung der Sekretion der Entzündungszytokine IL-6 (A) und IL-8 (B) durch Zugabe steigender Konzentrationen von TPCA-1, einem Hemmstoff der IKK-2-Kinase und damit des NF κ B-Signalwegs.



Der MAPK-Inhibitor SB 203580 inhibierte die LPS-stimulierte IL-6-Freisetzung (IC_{50} : 0,7 μ M), hatte aber keinen Effekt auf die IL-8-Sekretion. TPCA-1, ein Inhibitor des NF κ B-Signalwegs, inhibierte die Sekretion beider Interleukine (Abb. 1) mit IC_{50} -Werten von 1,2 μ M (IL-6) und 1,7 μ M (IL-8). Der Phosphoinositid-3-Kinase-Hemmer AS252424 hingegen hatte keinen Einfluss auf die Produktion der beiden gemessenen Zytokine. Gleichzeitige Zugabe von Lungensurfactant (Curosurf®) führte zu einer Aufhebung der inhibierenden Wirkung von TPCA-1 und SB 203580.

Schlussfolgerung

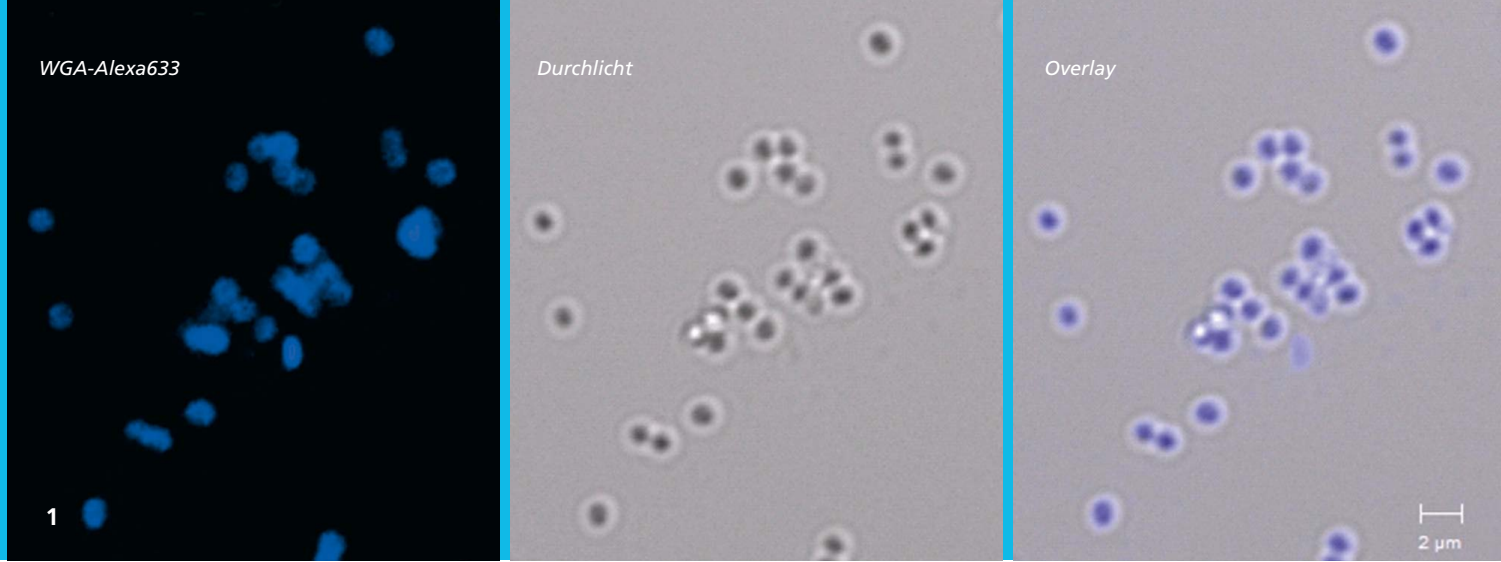
Calu-3-Zellen können als In-vitro-Modell für das Bronchialepithel bei Patienten mit COPD eingesetzt werden, wobei sich die chronische Entzündungsreaktion simulieren lässt. Das Zellkulturmodell ist ein viel versprechendes Screening-System für inhalierbare Medikamente. Wie am Beispiel von TPCA-1 und SB 203580 gezeigt wurde, kann das Absorptionsverhalten von Arzneimitteln in Anwesenheit von Lungensurfactant massiv verändert sein. Pulmonale In-vitro-Modelle sollten daher den Einfluss von Surfactant berücksichtigen.

Das Projekt wurde im Rahmen des »Exploratory Healthcare Research Program« von Johnson & Johnson gefördert.



KONTAKT

Dr. med. vet. Tanja Hansen
Telefon +49 511 5350-226
tanja.hansen@item.fraunhofer.de



Projektbericht

FRAUNHOFER-PROJEKT »AESKULAP«: FORSCHER ENTWICKELN SCHNELLE UND SICHERE SEPSIS-DIAGNOSTIK

ZUSAMMENFASSUNG

Die Sepsis – umgangssprachlich auch Blutvergiftung – ist in Deutschland die dritthäufigste Todesursache. Entwickelt sich eine Sepsis, wird sie umgehend mit Breitbandantibiotika behandelt, eine nicht immer optimale Therapie. Breitbandantibiotika setzen Ärzte ein, weil die Identifizierung der Erreger und möglicher Antibiotikaresistenzen sehr zeitaufwändig ist und der Patient nicht schnell genug behandelt werden könnte. In dem gemeinschaftlichen Projekt »Aeskulap« entwickeln Wissenschaftler der Fraunhofer-Institute FIT, IMPS, ILT und ITEM eine Technologie, mit der sich Erreger schneller erkennen und Resistenzen schneller testen lassen – damit der Sepsis-Patient zukünftig schnell eine sichere Therapie erhält.

Für eine sichere Diagnose von Sepsis-Erregern werden herkömmlich zunächst Kulturen aus Blutproben angelegt – ein Vorgehen, das viel Zeit benötigt, die man aber für eine Behandlung der Sepsis nicht hat. Nun wollen Wissenschaftler der Fraunhofer-Institute FIT, IMPS, ILT und ITEM gemeinsam im Projekt »Aeskulap« eine schnellere Diagnostik-Methode entwickeln. Dafür sollen die Erreger zunächst mit spezifischen Antikörpern farblich markiert und dann mit einem mikrofluidischen Sortierer aufgetrennt werden. Anschließend sollen die Bakterien unter optimierten Kulturbedingungen vermehrt und auf ihre Antibiotika-Empfindlichkeit getestet werden. Die Kultur soll spätestens nach sechs Stunden abgeschlossen sein. Diese Kultur ist bisher der zeitraubendste Schritt, den es zu verkürzen gilt, um in signifikant kürzerer Zeit den Infektionserreger und seine möglichen Antibiotikaresistenzen zu diagnostizieren. Und um schließlich den Patienten gezielt mit ausgewählten Antibiotika behandeln zu können.

1 Antikörperfärbung des grampositiven Keims *Staphylococcus aureus*. Der Vergleich verschiedener mikroskopischer Bilder zeigt, dass die Färbung spezifisch alle *Staphylococcus-aureus*-Bakterien in dem Präparat anfärbt. Darstellung von links nach rechts: Fluoreszenzfärbung mit dem Farbstoff Alexa 633, im Vergleich dazu das Durchlichtbild und schließlich Fluoreszenzbild und Durchlichtbild übereinandergelegt.



Spezifische Antikörper gegen Sepsis-Keime finden

Am Fraunhofer ITEM wurden zunächst Keime ausgewählt, die für mehr als 95 Prozent der Sepsis-Fälle ursächlich sind: grampositive Keime der Spezies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* sowie gramnegative Erreger wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae*. Von diesen klinisch relevanten Keimen wurden Reinkulturen in dem Infektionslabor des Fraunhofer ITEM unter S2-Bedingungen angelegt und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Damit die Erreger sicher diagnostiziert werden können, sollen sie mit spezifischen Antikörpern gefärbt werden, die die zweifelsfreie Erkennung in einem Durchflusszytometer, einem fluidischen Sortierer, ermöglichen. Dafür wurden experimentell die Färbeprotokolle geprüft, die eine Färbung der Keime mit nachfolgend uneingeschränkter Vitalität erlauben, um sie anschließend zu kultivieren. Für die Färbung der Erreger wurden käuflich erhältliche Antikörper ausgewählt und bezüglich ihrer Spezifität geprüft. Um die Funktionalität des Sortierers sicherzustellen, müssen die ausgewählten Antikörper ausschließlich den Zielorganismus erkennen und dürfen nicht oder nur gering an weitere Bakterienspezies binden. Dies stellt bei vielen Antikörpern ein Problem dar, da die allgemeinen experimentellen Anwendungen häufig eine genaue Spezifitätsprüfung nicht erfordern. Darum müssen alle im Projekt »Aeskulap« eingesetzten Antikörper einer umfangreichen Prüfung unterzogen werden. Ob eine Färbung spezifisch und ausschließlich für den betreffenden Keim ist, wird sowohl mit dem Durchflusszytometer als auch unter dem Laserscanningmikroskop überprüft.

Bisher fanden die Wissenschaftler einen spezifisch färbenden Antikörper gegen *Staphylococcus aureus*, dessen Spezifität sie sowohl durchflusszytometrisch als auch mikroskopisch nachweisen konnten (Abb. 1). Der Antikörper bindet nur an den Zielorganismus, lässt aber weitere Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* ungefärbt. Desgleichen wurde die Unterscheidung der Keime hinsichtlich ihrer Oberflächeneigenschaften nach grampositiv und gramnegativ mittels fluoreszenzgekoppelter Markierung gezeigt. Die Vitalität und damit die Wachstumskinetik aller untersuchten Keime wurde durch die verwendeten Antikörper und Färbemethoden nicht beeinflusst. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um in der nachfolgenden Kultur eine valide Antibiotikatestung zu etablieren. Die schnelle Antibiotikatestung im Mikroformat ist ein weiterer wichtiger Schritt für die Beschleunigung des Verfahrens.

Ausblick

Mit dem Nachweis einer spezifischen Färbung und einer uneingeschränkten Vitalität der Bakterien nach der Färbeprozedur ist ein wichtiger Schritt zur Entwicklung des mikrofluidischen Sortierers getan. In der nahen Zukunft stehen die Arbeiten zur Miniaturisierung der Kulturbedingungen für die Bakterien und die Validierung der Prüfung der Antibiotikaresistenzen im miniaturisierten Format auf dem Plan.



KONTAKT

Dr. Meike Müller
Telefon +49 511 5350-262
meike.mueller@item.fraunhofer.de

Geschäftsfeld 1

PROJEKTÜBERSICHT

Immuntoxikologische
Bewertung von Metallen

Wirksamkeit von Bio-
pharmaka bei Primaten

Bewertung der Toxizität von
luftgetragenen Schadstoffen
in vitalen Lungenschnitten
(Precision-cut lung slices)

Testung von Arzneimitteln in
Asthmamodellen der Maus
und der Ratte einschließlich
Lungenfunktionsmessung

Testung von Arzneimitteln in
Infektionsmodellen

Testung von Arzneimitteln in
Maus- und Rattenmodellen
der LPS-induzierten Entzündung

Testung pflanzlicher
Arzneimittel in Entzündungs-
modellen

In-vitro-Testung pflanzlicher
Arzneimittel

Entwicklung eines Zellkultur-
modells für die Testung von
Arzneimitteln zur Behandlung
der COPD

In-vivo- und Ex-vivo-Bild-
gebung der Immunantwort
mit dem 2-Photonen-
Mikroskop

Sicherheitspharmakologie
der Lunge

Testung von bronchodilato-
risch wirksamen Pharmaka

Wirkung von Nanopartikeln
in der Lunge

Infektionserregernachweis in
Blutproben und auf Medizin-
geräten

Tumorthherapie mit
versorgungsunabhängigen
implantierbaren Mikrodosier-
systemen (TUDOS)

Entwicklung einer Plattform
zur GMP-gerechten Herstel-
lung von rekombinanten
Antikörpern auf der Basis von
mikrobiellen Kulturen und
Säugerzellkulturen

Entwicklung einer Plattform
zur GMP-gerechten Herstel-
lung von Nukleinsäuren/DNA-
Wirkstoffen

Betrieb einer Reinraumanlage
zur aseptischen Herstellung
von Prüfartikeln auf der
Basis von Infusionslösungen

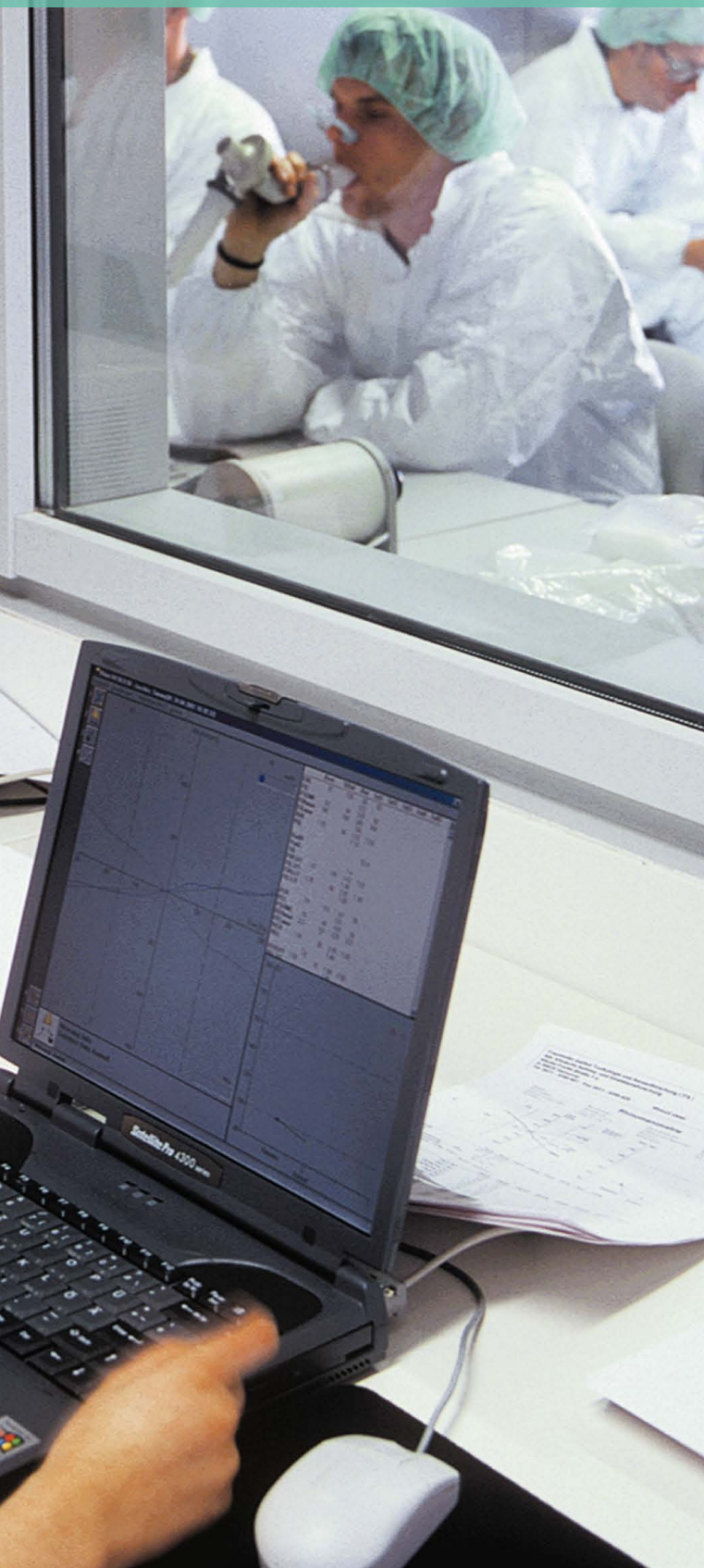
GMP-konforme Herstellung
von Provokationsprüfartikeln
für klinische Studien
der Abteilung Klinische Atem-
wegsforschung

Entwicklung eines Verfahrens
zur GMP-Herstellung von
Pilz-Zellbanken auf der Grund-
lage von Sporensuspensionen

2



KLINISCHE ATEMWEGSFORSCHUNG



Projektberichte

Universelles Allergenprovokationsverfahren in der Fraunhofer ECC validiert

Reproduzierbare Entzündungsreaktion nach segmentaler Endotoxinprovokation bei gesunden Probanden

RIBOLUTION: Neue Biomarker für Diagnostik und Therapie

Vorlaufforschung

Nicht-invasive Quantifizierung der Atemwegs-entzündung mittels Kernspintomographie

Niedrig dosierte inhalative Endotoxinexposition – ein Modell für die frühe klinische Arzneimittel-entwicklung

Pilotstudie: Wirkung von Gräserpollen auf Hautveränderungen bei Patienten mit Neurodermitis

Projektübersicht



Im Geschäftsfeld Klinische Atemwegsforschung werden klinische Studien zur Wirksamkeitsprüfung neuer Pharmaka, zur Entwicklung neuer Biomarker und zur Beurteilung des Gefährdungspotenzials durch Luftschadstoffe durchgeführt. Das Fraunhofer ITEM kooperiert dabei eng mit der Medizinischen Hochschule Hannover und arbeitet mit Industrieunternehmen und verschiedenen Forschungseinrichtungen zusammen.

Schwerpunkt dieses Geschäftsfelds sind klinische Arzneimittelstudien. Es werden klinisch-pharmakologische Probanden- und Patientenstudien zu Fragen der Wirksamkeit und Sicherheit neuer antiobstruktiver und antiallergischer Medikamente unter Bedingungen der »Good Clinical Practice« durchgeführt. Dafür werden frühe klinische Studien für die Phasen I und II konzipiert und durchgeführt. Um unter kontrollierter Allergenprovokation die Wirksamkeit von neuen Antiallergika bei Patienten mit Heuschnupfen zu überprüfen, wird in Zusammenarbeit mit der Abteilung Aerosoltechnologie ein Gräserpollen-Inhalationsraum betrieben, die so genannte Fraunhofer Environmental Challenge Chamber, kurz Fraunhofer ECC. Dieser Raum wird auch mit Hausstaub-Allergenen betrieben, um die Wirksamkeit



einer spezifischen Immuntherapie zu prüfen. Durch das universelle, patentierte Aerosolverfahren können zukünftig weitere Allergene – wie Katzenhaare oder Birkenpollen – eingesetzt werden. Bronchoskopische Untersuchungen nach Inhalation oder Instillation von Allergenen, Endotoxin oder Medikamenten sind ein weiterer Schwerpunkt der klinischen Forschungsaktivitäten. Weltweit verfügen nur wenige Institutionen über vergleichbares Know-how und technische Möglichkeiten.

Im DFG-Sonderforschungsbereich »Immunreaktionen der Lunge bei Infektion und Allergie« (SFB 587) und im Deutschen Zentrum für Lungenforschung werden klinische Forschungsprojekte bearbeitet, die sich mit Pathomechanismen der allergischen Entzündung in der Lunge und der Entwicklung neuer Biomarker befassen.

Das Geschäftsfeld zeichnet sich durch einen hohen technischen Standard und fachliche Kompetenz aus und stützt sich zurzeit auf die folgenden Kernkompetenzen: pneumologische und allergologische Forschungsmethoden, klinische Arzneimittelprüfungen für die Indikationen Allergie, Asthma und COPD sowie Aerosolverfahrenstechnik und Aerosolanalytik.

KONTAKT



Prof. Dr. med. Norbert Krug
Telefon +49 511 5350-602
norbert.krug@item.fraunhofer.de



Prof. Dr. med. Jens Hohlfeld
Telefon +49 511 5350-604
jens.hohlfeld@item.fraunhofer.de

Projektbericht

UNIVERSELLES ALLERGEN- PROVOKATIONSVERFAHREN IN DER FRAUNHOFER ECC VALIDIERT

ZUSAMMENFASSUNG

Fraunhofer-Forscher haben ein universelles, allergenunabhängiges nasales Provokationsverfahren entwickelt. Für die Verwendung in Probandenstudien wurden zugelassene Allergenextrakte in geeigneten Laktose-Lösungen rekonstituiert und durch so genannte Sprühtrocknung aerosolisiert. Die Wirksamkeit, Sicherheit und Unbedenklichkeit dieses neuen Provokationsverfahrens zeigte eine klinische Studie bei 18 Patienten mit Hausstauballergie und einer ganzjährigen Rhinitissymptomatik.

Die Prävalenz allergischer Erkrankungen nimmt weltweit zu. Die spezifische Immuntherapie zur Toleranzentwicklung ist eine sehr wichtige Behandlungsform. Die Prüfung neuer spezifischer Immuntherapeutika bei Patienten mit Allergien unter Umweltbedingungen ist häufig erschwert durch die Variabilität der Allergensaison und der Allergengehalte in der Umwelt. Die Entwicklung eines universellen Allergenprovokationsverfahrens in der Fraunhofer Environmental Challenge Chamber (Fraunhofer ECC) könnte einen wesentlichen Beitrag zur Standardisierung der Allergenprovokation und zur beschleunigten Medikamentenentwicklung leisten. Das verwendete Provokationsallergen wäre dann austauschbar und für die jeweilige Immuntherapie spezifisch einsetzbar.

Allergen-Lyophilisat wird durch Sprühtrocknung aerosolisiert

Durch Sprühtrocknung wird eine Lösung eines zugelassenen, handelsüblichen Allergen-Lyophilisats in einer 10-prozentigen Laktose-Lösung als Hilfsstoff aerosolisiert. Dadurch werden Aerosolteilchen mit einer Partikelgröße über 10 µm generiert, die vorzugsweise in der Nase und nicht in der Lunge deponiert werden. Die jeweils gewünschte Allergenkonzentration im 47 m² großen Provokationsraum regelt eine extern angesteuerte Infusionspumpe. Die Partikelanzahl wird neben der Größenverteilung der Partikelmassen, Temperatur, Luftfeuchte und Luftaustauschrate kontinuierlich überwacht. Mit einem etablierten Verfahren zur Filterprobennahme wird die Gesamtmassenkon-



1

1 Während der Provokationsstudien in der Fraunhofer ECC überwacht das medizinische Team regelmäßig die Lungenfunktion der Probanden.

zentration des Aerosols ermittelt und der Allergengehalt im Aerosol wird mittels ELISA-Technik bestimmt.

Klinische Studie zeigt Wirksamkeit und Sicherheit des Provokationsverfahrens

Um diese Provokationstechnik für künftige Arzneimittelstudien zu validieren, wurde mit finanzieller Unterstützung der Firma Allergopharma eine einfachblinde, placebokontrollierte klinische Prüfung durchgeführt. In der Fraunhofer ECC wurden 18 Patienten mit Allergie gegenüber Hausstaub für jeweils vier Stunden exponiert. Über einen Zeitraum von fünf Perioden mit mindestens einer Woche Abstand wurden drei umweltübliche Konzentrationen (250-1000 SQ-E/m³) des Hausstaubmilbenallergens Der-p1, eine Wiederholung einer schon bekannten Der-p1-Konzentration sowie 10-prozentige Laktose-Lösung als Placebo getestet. Der Schweregrad der Symptomatik wurde mittels Symptomen-Score (Nasenjucken, Nasenlaufen, Niesen und Verstopfung) beurteilt und die nasale Sekretion gemessen. Als Sicherheitsparameter wurde die Lungenfunktion der Probanden regelmäßig überwacht.

Allergenkonzentrationen und Partikelgrößen waren über die Dauer der Exposition konstant. Die durch das Sprühtrocknungsverfahren generierten Allergenpartikel hatten einen Durchmesser von 13 µm. Nur 11 Prozent dieser Allergenpartikel wiesen eine Größe unter 10 µm auf. Pulmonale Nebenwirkungen wurden nicht ausgelöst. Die Bewertung des nasalen Symptomen-Scores ergab, dass

1. alle eingesetzten Allergenkonzentrationen ähnlich starke Symptome im Zielorgan Nase auslösten,
 2. die Symptomatik bei Verwendung der gleichen Allergenkonzentration reproduzierbar war und
 3. diese sich signifikant von der Placebo-Gruppe unterschieden.
- Eine Dosis-Wirkungsbeziehung konnte mit den in der Pilotstudie verwendeten Allergenkonzentrationen nicht dargestellt werden.

Fazit

Das neue Provokationsverfahren ist wirksam und sicher. Es stellt eine sehr gute Ausgangsbasis dar für die Anwendung des Provokationsverfahrens in klinischen Studien unter gut kontrollierter Allergen-Exposition.



KONTAKT

Katrin Luer
Telefon +49 511 5350-621
katrin.lueer@item.fraunhofer.de

Projektbericht

REPRODUZIERBARE ENTZÜNDUNGSREAKTION NACH SEGMENTALER ENDOTOXIN-PROVOKATION BEI GESUNDEN PROBANDEN

ZUSAMMENFASSUNG

Studien zum Nachweis des Wirkprinzips – »Proof-of-Concept« – mit spezifischen entzündungsauslösenden Provokationen sind ein fester Bestandteil der frühen klinischen Entwicklung entzündungshemmender Medikamente. Durch eine segmentale Provokation mit Lipopolysaccharid (LPS) lässt sich bei gesunden Probanden eine Entzündung der Atemwege hervorrufen. Dabei kann LPS gezielt in einem bestimmten Bereich der Lunge appliziert und zusätzlich bei derselben Person eine Vergleichsprovokation mit einem Trägerstoff in einem anderen Segment durchgeführt werden. Die Reaktion auf LPS kann sowohl zwischen einzelnen Probanden als auch innerhalb derselben Person variieren, und

dies muss bei der Planung klinischer Prüfungen mit berücksichtigt werden. Ziel dieser Studie war es daher, die intra- und interindividuelle Variabilität der Entzündungsreaktion auf LPS zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach der Provokation zu bewerten. Die maximale Zytokinreaktion wurde 6 Stunden nach der LPS-Provokation beobachtet, wohingegen der zelluläre Einstrom von neutrophilen Granulozyten und Monozyten 24 Stunden nach der Exposition stärker war. Angesichts eines reproduzierbaren mehr als 50-fachen Anstiegs der neutrophilen Granulozyten 24 Stunden nach der LPS-Behandlung konnte diese Studie zeigen, dass die segmentale Provokation mit LPS ein geeignetes Modell für Proof-of-Concept-Studien mit dem primären Endpunkt Atemwegsneutrophilie ist.



Einleitung

Es ist notwendig, neue entzündungshemmende Medikamente für COPD-Patienten zu entwickeln. Diese werden zunächst in Proof-of-Concept-Studien mit gesunden Probanden getestet, um eine krankheitsbedingte erhöhte Variabilität der Reaktion zu vermeiden. Dadurch sind kleinere Fallzahlen möglich und die Zahl der Menschen, die gegenüber einer neuen Substanz exponiert werden, wird auf ein Minimum reduziert. LPS, ein Hauptbestandteil der äußeren Membran von Bakterien, führt zu einer akuten Entzündungsreaktion, die der in den chronisch entzündeten Atemwegen von COPD-Patienten ähnelt. Diese Reaktion ist durch einen Einstrom von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowie durch einen Anstieg entzündungsfördernder Zytokine gekennzeichnet.

In dieser Studie untersuchten Wissenschaftler des Instituts die intra- und interindividuelle Variabilität der entzündlichen Reaktion auf LPS zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach einer LPS-Provokation, um das Modell der segmentalen Provokation mit LPS weiter zu charakterisieren und zu validieren.

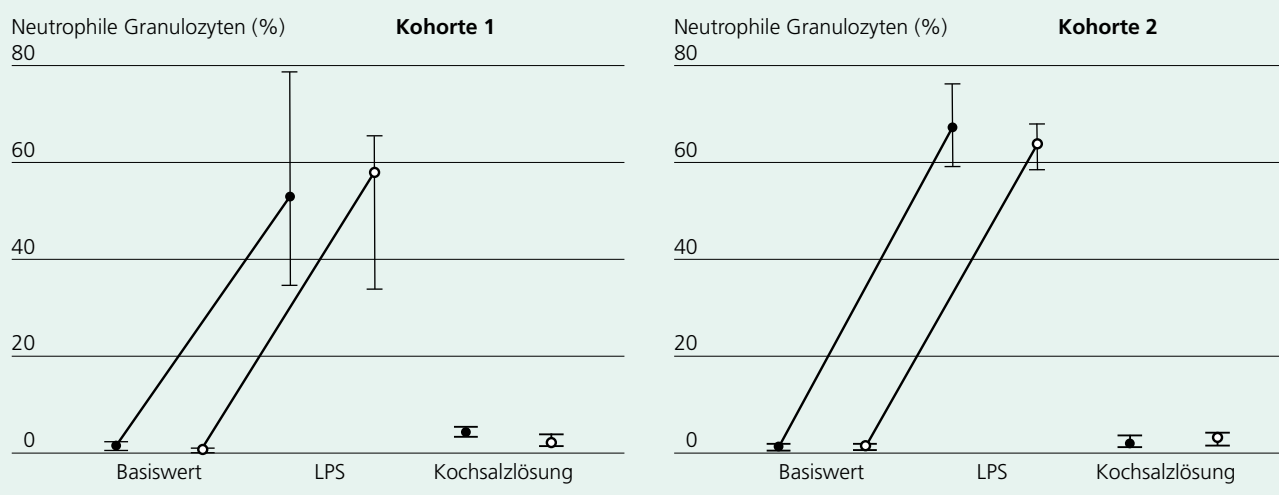
Methoden

Zwei Kohorten mit je zehn Testpersonen wurden innerhalb von vier Wochen je zwei segmentalen LPS-Provokationen unterzogen. Bei den Probanden beider Kohorten wurde zunächst eine Bronchoskopie durchgeführt, in deren Verlauf eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) eines Segments zur Ermittlung der Ausgangswerte erfolgte und dann im rechten Mittellappen LPS und im gegenüberliegenden Lungensegment Kochsalzlösung appliziert wurde. Die Entzündungsreaktion wurde in der BAL-Flüssigkeit 6 Stunden (Kohorte 1) und 24 Stunden (Kohorte 2) nach der Behandlung analysiert. Die systemischen Auswirkungen der Provokation wurden bis zu 26 Stunden nach der Exposition im Blutserum bestimmt.

Ergebnisse

Der durchschnittliche prozentuale Anteil und die Anzahl der neutrophilen Granulozyten und Monozyten waren nach der LPS-Provokation im Vergleich zu der Behandlung mit Kochsalzlösung erhöht (Abb. 1 und 2). Die Zunahme der Entzündungszellen war reproduzierbar (Intraclass-Korrelationskoeffizient $> 0,65$), ebenso wie die Konzentration von MCP-1 in der BAL-Flüssigkeit 6 Stunden nach der Provokation und Laktoferrin, GRO- α und ENA nach 24 Stunden.

Abb. 1: Prozentualer Anteil neutrophiler Granulozyten in der BAL-Flüssigkeit vor der Behandlung und nach segmentaler LPS-Provokation. Die Variabilität der Reaktion ist 6 Stunden (Kohorte 1) nach der Provokation größer als 24 Stunden danach (Kohorte 2). Gefüllte Symbole: Daten der ersten Provokation; ungefüllte Symbole: zweite Provokation nach 4 Wochen. In dem mit Kochsalzlösung behandelten Segment war kein Anstieg der neutrophilen Granulozyten zu beobachten.

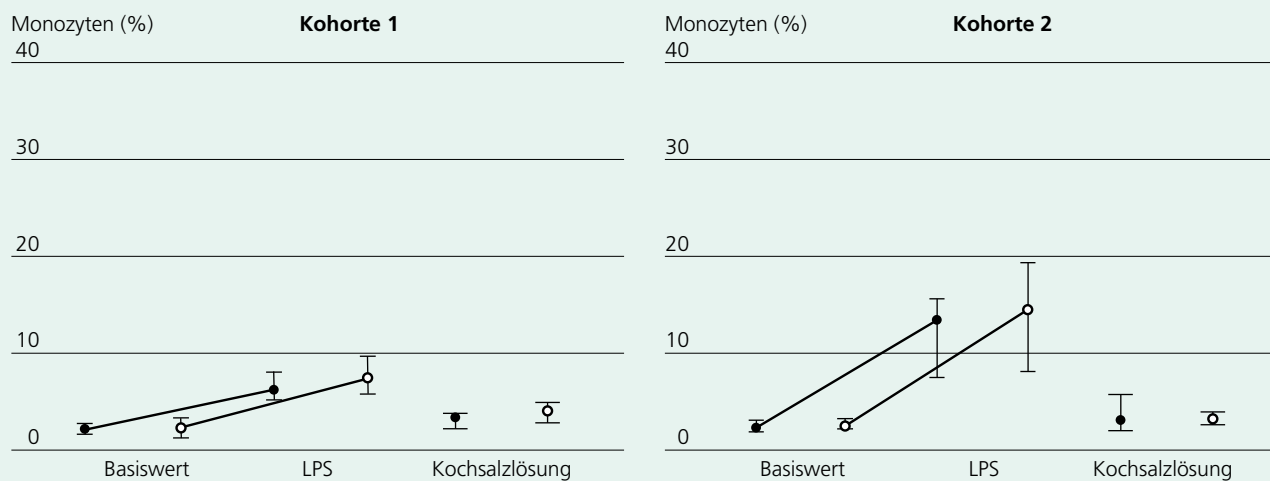


Die Serumkonzentration von CC16, IL-6, Laktoferrin, MCP-1 und MIP-1b zeigte in beiden Kohorten einen deutlichen Anstieg nach der LPS-Provokation. CRP war am Tag nach der LPS-Provokation im Serum signifikant erhöht. Dabei waren die Werte in der Kohorte 1 höher, was möglicherweise auf eine Reaktion auf die Durchführung der ersten BAL zurückzuführen ist. Für L-Selektin und SP-D wurden keine systemischen Wirkungen der LPS-Provokation beobachtet.

Fazit

Es konnte gezeigt werden, dass das Modell der segmentalen LPS-Provokation für Proof-of-Concept-Studien geeignet ist. Dank der jetzt vorliegenden umfassenden Daten zur intra- und interindividuellen Variabilität der Entzündungsreaktion auf die LPS-Behandlung können künftige klinische Studien besser geplant werden. Die in dieser Studie erhobenen Daten werden außerdem helfen, den geeigneten Zeitpunkt für die Bestimmung einzelner Marker zu ermitteln. Ferner wurde mit dieser Studie eine reproduzierbare systemische Reaktion mit einer spezifischen Kinetik für einzelne Marker nachgewiesen. Dies kann dazu beitragen, künftig die Entzündungsreaktion nach segmentaler LPS-Provokation mit weniger invasiven Methoden zu überwachen.

Abb. 2: Prozentualer Anteil von Monozyten in der BAL-Flüssigkeit vor der Behandlung und nach segmentaler LPS-Provokation. Gefüllte Symbole: Daten der ersten Provokation; ungefüllte Symbole: zweite Provokation nach 4 Wochen.



KONTAKT

Dr. Olaf Holz
 Telefon +49 511 5350-323
olaf.holz@item.fraunhofer.de

Projektbericht

RIBOLUTION: NEUE BIOMARKER FÜR DIAGNOSTIK UND THERAPIE

ZUSAMMENFASSUNG

Mit RIBOLUTION, einem Projekt der Fraunhofer-Zukunftsstiftung, startete Anfang 2011 ein interdisziplinäres Vorhaben im Bereich der molekularen Diagnostik. Fünf Fraunhofer-Institute, unter ihnen das Fraunhofer ITEM, haben sich zusammengeschlossen, um eine neue Molekülklasse für die Biomarker-Entwicklung zu erschließen: die so genannten nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs). Diese Moleküle sollten sich aufgrund ihrer hohen Spezifität hervorragend als Biomarker für die Diagnostik und die Therapiekontrolle von Krankheiten eignen. Am Fraunhofer ITEM soll ein prognostischer Biomarker für die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) identifiziert und validiert werden.

Auf dem Weg zu einer personalisierten Medizin

Der demografische Wandel stellt eine enorme Herausforderung für unser Gesundheitssystem dar. In einer immer älter werdenden Bevölkerung steigt insbesondere die Zahl der Krebspatienten und chronisch entzündliche und degenerative Erkrankungen nehmen zu. Um diese Probleme und ihre Folgekosten zu bewältigen, müssen Erkrankungen frühzeitig erkannt und individuell behandelt werden. Eine solche personalisierte Medizin aber erfordert eine effektive Diagnostik mit molekularen Biomarkern. Sowohl in der klinischen Diagnostik als auch in klinischen Studien der pharmazeutischen Industrie werden diese spezifischen Biomarker in steigendem Maße benötigt. Die Zahl neuer, validierter Biomarker kann jedoch derzeit mit dem rasant wachsenden Bedarf nicht Schritt halten.

Das Projekt RIBOLUTION (Innovative Ribonucleic Acid-based Diagnostic Solutions for Personalized Medicine) – ein interdisziplinäres Vorhaben von fünf Fraunhofer-Instituten – will eine neue Molekülklasse mit hohem, bisher kaum ausgeschöpftem Biomarker-Potenzial erschließen, die so genannten nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs). Diese ncRNAs haben wichtige Aufgaben: sie regulieren Gene, nach deren Bauplänen Proteine zusammengesetzt werden, und können somit als Steuer-Software verstanden werden. Ziel von RIBOLUTION ist es, Verfahren und Methoden zu entwickeln, mit denen diese molekularen Biomarker effizient identifiziert und validiert werden können. Am Ende des Projekts soll ein automatisierter, durch ein hohes Maß an Prozess- und Qualitätskontrolle sowie durchgehende



Dokumentation zertifizierbarer Prozess stehen, der für Forschung und Industrie neue Maßstäbe setzt.

RIBOLUTION – über Fachgrenzen hinweg

In dem Fraunhofer-Verbundprojekt arbeiten unter der Federführung von Professor Friedemann Horn vom Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI das Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin ITEM, das Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik IGB, das Institut für Produktionstechnik und Automatisierung IPA sowie das Institut für Angewandte Informationstechnik FIT zusammen. Aufgebaut wird ein modulares und flexibles Automatisierungssystem für die Analyse von ncRNAs, um beliebige Fragen zu Biomarkern schnell beantworten zu können. Gefragt ist ein System mit durchgängiger Inline-Prozess- und Qualitätskontrolle zum Screening von großen Kohorten. Zusätzlich sollen hochempfindliche Nukleinsäure-Sensoren individuelle Nukleinsäure-basierte Biomarker aufspüren.

Neben einer innovativen, technischen Screening-Plattform haben die Biomarker, die im Rahmen des Projekts entwickelt werden, selbst ein besonderes Verwertungspotenzial. Die Fokussierung auf ncRNA-Moleküle gewährleistet den Zugriff auf einen gigantischen Pool potenzieller Marker, die bislang überwiegend uncharakterisiert sind.

Die Leistungsfähigkeit dieses Prozesses soll an drei prototypischen Erkrankungen dargestellt werden: Entwickelt werden soll ein prognostischer Biomarker für die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), ein Marker für die Früherkennung des Prostatakarzinoms und ein Marker zur Therapiewahl für Rheumatoide Arthritis. Die gewählten Krankheiten haben große gesellschaftliche wie wirtschaftliche Relevanz und sie alle eint eine unzureichend gelöste Fragestellung der Diagnostik und/oder Therapiewahl.

COPD – Marker für Diagnostik und Therapie

Das Fraunhofer ITEM bringt die klinische Kompetenz im Bereich der COPD ein. Im Rahmen von RIBOLUTION wird eine Fraunhofer-COPD-Kohorte mit verschiedenen Schweregraden der Erkrankung aufgebaut und charakterisiert sowie das Potenzial von ncRNA-Biomarkern in dieser Gruppe analysiert. Darüber hinaus wird in Kooperation mit GlaxoSmithKline das Potenzial der ncRNA-Marker in einer großen, bereits vorliegenden und charakterisierten COPD-Kohorte, der ECLIPSE-Kohorte, untersucht und validiert.

Das Gesamtprojekt gliedert sich in zwei dreijährige Phasen. In der ersten Phase wird zum einen die automatisierte Prozessstrecke entwickelt, zum anderen wird das Biomarker-Screening mit zunächst noch konventioneller, händischer Methodik aufgenommen und im letzten Abschnitt dieser Phase mit dem automatisierten Prozess abgeglichen. Die zweite Projektphase eröffnet dann die Chance, mit Hilfe des in wesentlichen Teilen automatisierten Screening-Prozesses Biomarker schneller, effizienter und kostengünstiger für weitere Indikationen zu identifizieren und zu validieren. Es soll ein Patentcluster auf verschiedenen Ebenen der Biomarker-Entwicklung aufgebaut werden, welcher sich von den Markern selbst bis zu technischen Lösungen für die Automatisierungs- und Messtechnik erstreckt.

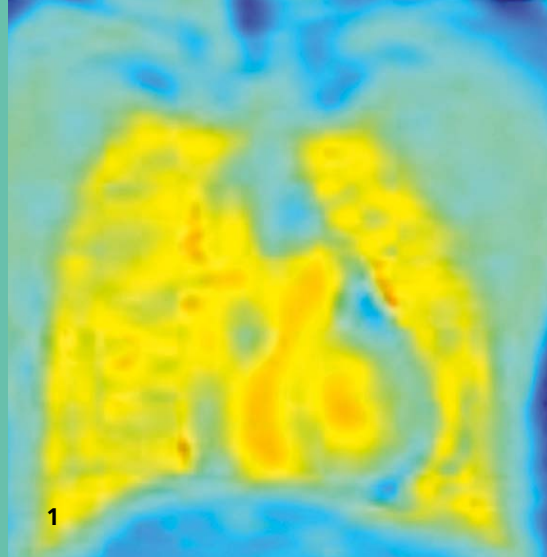


KONTAKT

Prof. Dr. med. Norbert Krug
Telefon +49 511 5350-602
norbert.krug@item.fraunhofer.de



Dr. Claus-Dieter Kroggel
Telefon +49 511 5350-103
claus.kroggel@vls.fraunhofer.de



Vorlaufforschung

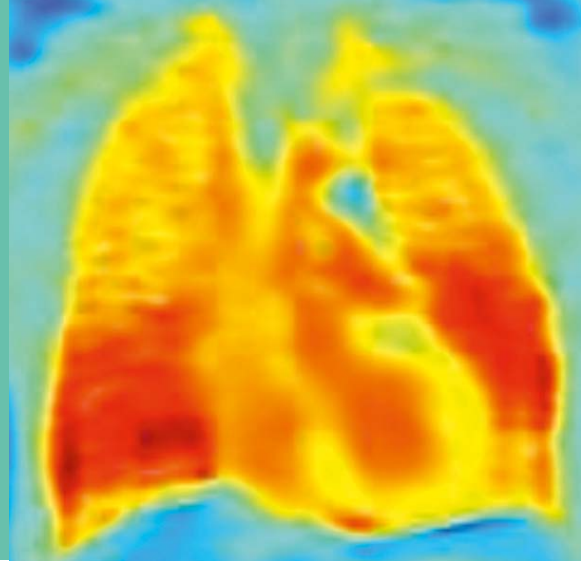
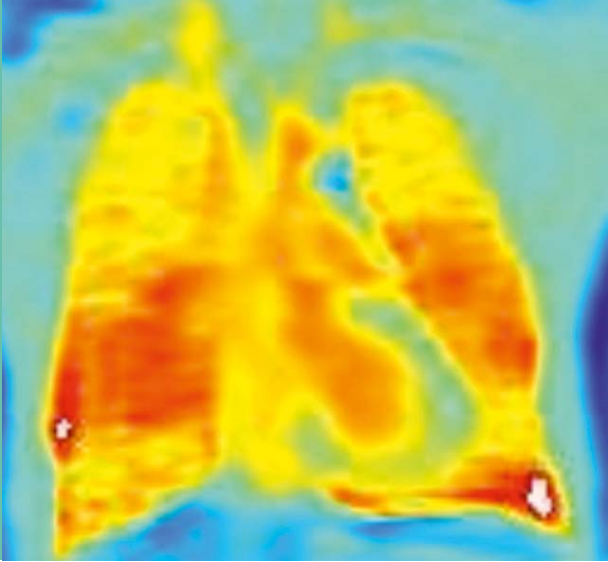
NICHT-INVASIVE QUANTIFIZIERUNG DER ATEMWEGSENTZÜNDUNG MITTELS KERNSPINTOMOGRAPHIE

ZUSAMMENFASSUNG

Für Untersuchungen neuer Medikamente gegen entzündliche Atemwegserkrankungen werden häufig Verfahren eingesetzt, die eine allergische Reaktion provozieren, wie z. B. die segmentale Applikation von Allergenen mittels Bronchoskopie. Bisher wird darauffolgend der Grad der lokalen allergischen Entzündung mittels bronchoalveolärer Lavage bestimmt. Wissenschaftler am Fraunhofer ITEM untersuchen nun, ob die lokale Entzündungsreaktion auch auf einem nicht-invasiven Weg – mit Kernspintomographie – nachgewiesen werden kann. Erste Ergebnisse zeigen, dass dieses möglich ist.

Die nicht-invasive Erkennung und Verlaufsbeurteilung der Atemwegsentzündung bei entzündlichen Atemwegserkrankungen wie dem Asthma bronchiale oder der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) ist sowohl für die Therapiesteuerung als auch für die Beurteilung der Wirksamkeit neuer Medikamente von großer Bedeutung. Für die Beurteilung der Wirksamkeit neuer Medikamente werden in der frühen Phase der Medikamentenentwicklung häufig Provokationsverfahren eingesetzt, die eine schwere Erkrankung oder eine krisenhafte Verschlechterung der Erkrankung simulieren. Beim Asthma bronchiale ist dies neben der inhalativen Allergenprovokation die bronchoskopische segmentale Allergenprovokation. Hier ist die lokale Darstellung der Entzündung mit nicht-invasiven Verfahren eine besondere Herausforderung. In einem aktuellen Forschungsvorhaben in Zusammenarbeit mit dem Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Medizinischen Hochschule Hannover soll überprüft werden, ob die lokale Entzündung nach segmentaler Allergenprovokation mittels Kernspintomographie erfasst und quantifiziert werden kann.

Hierzu werden Patienten mit leichtem Asthma bronchiale im Rahmen einer Spiegelung der Atemwege (Bronchoskopie) einer segmentalen Allergenprovokation unterzogen. Eine Kernspintomographie der Lunge mit Aufzeichnung verschiedener Sequenzen erfolgt vor sowie 6 und 24 Stunden nach der Allergenprovokation (Abb. 1). Darüber hinaus wird nach 24 Stunden eine zweite Bronchoskopie durchgeführt und



der Grad der lokalen Entzündung mittels bronchoalveolärer Lavage (BAL) bestimmt. Der zelluläre Entzündungszustand wird dann mit Veränderungen in der Kernspintomographie verglichen.

Erste Ergebnisse zeigen, dass sich die lokale allergische Entzündung in der Kernspintomographie darstellen lässt. Die semiquantitative Beurteilung der Entzündungsschwere in der Bildgebung korreliert dabei mit der graduierten zellulären Entzündung in der BAL. Ziel ist die Entwicklung eines kernspintomographischen Verfahrens, mit dem die lokale Entzündung nach segmentaler Allergenprovokation nicht-invasiv im zeitlichen Verlauf dargestellt werden kann. Die Ergebnisse der Pilotstudie werden im Mai 2012 auf dem Jahreskongress der American Thoracic Society vorgestellt.

1 Kernspintomographie
(T1-Mapping) vor (links) sowie
6 Stunden (Mitte) und 24 Stunden (rechts) nach segmentaler
Allergenprovokation im
Mittellappen und in der Lingula
(Bildquelle: MHH, Institut für
Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Priv.-Doz.
Dr. Jens Vogel-Claussen).



KONTAKT

Prof. Dr. Jens Hohlfeld
Telefon +49 511 5350-604
jens.hohlfeld@item.fraunhofer.de

Vorlaufforschung

NIEDRIG DOSIERTE INHALATIVE ENDOTOXINEXPOSITION – EIN MODELL FÜR DIE FRÜHE KLINISCHE ARZNEIMITTELENTWICKLUNG

ZUSAMMENFASSUNG

In der Abteilung Klinische Atemwegsforschung sind die endobronchiale Allergen- und Endotoxinprovokation mit Lipopolysaccharid (LPS) als Modelle etabliert und wurden bereits erfolgreich in der frühen Entwicklungsphase neuer entzündungshemmender Medikamente eingesetzt. Während bei diesen Provokationsmodellen eine invasive Bronchoskopie erforderlich ist, können die Provokationssubstanzen auch inhaliert werden, um entzündliche Prozesse auszulösen. Die inhalative Endotoxinexposition ist zwar nicht invasiv, jedoch wird dafür eine große Menge – etwa das 100-Fache – an Endotoxin benötigt (15-50 µg), um einen vergleichbaren Effekt zu erreichen wie durch die endobronchiale Provokation. Diese Mengen an Endotoxin stehen in GMP-Qualität nicht zur Verfügung. Zurzeit erproben die ITEM-Wissenschaftler daher eine neue Inhalationsmethode mit einer hocheffizienten Lungendepositionsrates, die die benötigte Menge Endotoxin auf 2 µg reduzieren könnte.

Zwölf gesunde Probanden (Nichtraucher, durchschnittliches Alter 38 ± 11 Jahre, FEV_1 : $104,2 \pm 7,3$ Prozent vom Soll) inhalierten jeweils 2 µg LPS, das mit einem Vernebler des Typs »Aeroneb solo« (Inspiration Medical) vernebelt und im Rahmen eines Standardinhalationsprotokolls (Mengendurchfluss 150 ml/s, 750 ml Endotoxin-Aerosol mit anschließender Inhalation von 300 ml reiner Luft) verabreicht wurde. Sechs Stunden nach der LPS-Provokation wurde Sputum induziert und die zelluläre Zusammensetzung mit den Ausgangswerten verglichen (letztere wurden bei der Einschlussuntersuchung 2-4 Wochen vor dem Provokationstermin erhoben). Die Körpertemperatur und die der Ausatemluft wurden vor sowie drei und sechs Stunden nach der Provokation gemessen.

Die LPS-Inhalation wurde von den Probanden gut und ohne negative Auswirkungen vertragen. Eine geringe, aber doch signifikante ($p = 0,005$) vorübergehende Veränderung der Lungenfunktion wurde eine Stunde nach der LPS-Inhalation beobachtet (im Mittel 95,9 % (90,8 %; 100 %) des Wertes vor der Provokation). Die Temperatur der ausgeatmeten Luft und die Körpertemperatur waren sechs Stunden nach der Provokation signifikant erhöht. Der Anteil neutrophiler Granulozyten im Sputum war gegenüber dem Ausgangswert erhöht ($p = 0,003$, siehe Abb. 1). Außerdem war eine Zunahme der Monozyten ($p = 0,01$) und der Gesamtzellzahl pro Milliliter Sputum ($p = 0,002$) zu beobachten.

Fazit

Die Inhalation einer niedrigen Dosis Endotoxin reicht aus, um einen signifikanten Einstrom von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in die Atemwege zu induzieren. Im zweiten Teil dieser Studie soll die Reproduzierbarkeit und die pharmakologische Modulierbarkeit dieser Reaktion beurteilt werden, um dieses Modell für Proof-of-Concept-Studien in der frühen Phase der Entwicklung neuer entzündungshemmender Arzneimittel zu validieren.



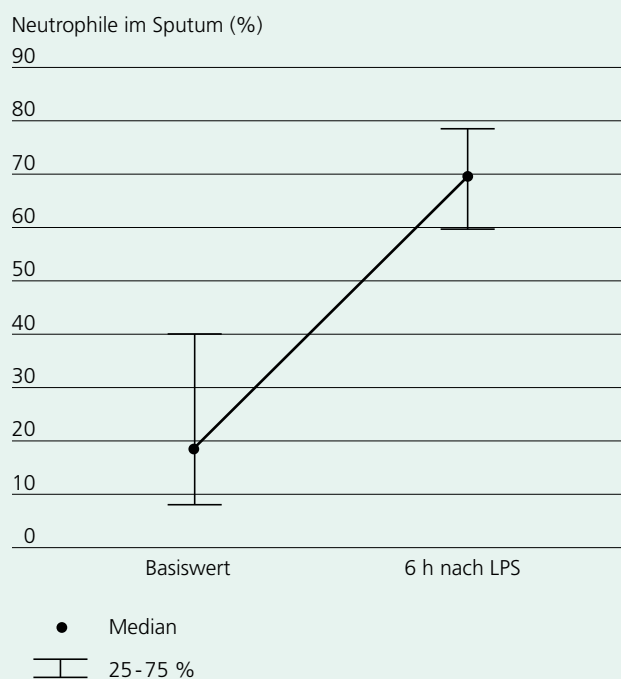
KONTAKT

Dr. Olaf Holz
Telefon +49 511 5350-323
olaf.holz@item.fraunhofer.de



Dr. Frank Schaumann
Telefon +49 511 5350-680
frank.schaumann@item.fraunhofer.de

Abb. 1: Zunahme des prozentualen Anteils von neutrophilen Granulozyten im Sputum gesunder Probanden nach inhalativer LPS-Provokation (n = 12).





Vorlaufforschung

PILOTSTUDIE: WIRKUNG VON GRÄSER-POLLEN AUF HAUTVERÄNDERUNGEN BEI PATIENTEN MIT NEURODERMITIS

Patienten mit Neurodermitis, die eine allergische Sensibilisierung aufweisen, haben häufig stärkere Hautveränderungen als nicht-allergische Patienten. Saisonale Verschlechterungen sprechen darüber hinaus dafür, dass insbesondere Pollenallergene das Hautbild bei Allergenkontakt verschlechtern. Der wissenschaftliche Beweis der Hypothese, dass Gräserpollen bei entsprechend sensibilisierten Patienten mit Neurodermitis einen Krankheitsschub auslösen können, steht bislang aus. In einer zurzeit laufenden doppelblinden, placebokontrollierten Parallelgruppenstudie wird gemeinsam mit der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Medizinischen Hochschule Hannover dieser Fragestellung nachgegangen und die Wirkung von Gräserpollen in der Fraunhofer Environmental Challenge Chamber (ECC) auf das Hautbild von Neurodermitikern untersucht. Die teilnehmenden Patienten werden nach einer Einschlussuntersuchung an zwei aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils vier Stunden in der Fraunhofer ECC entweder mit Gräserpollen oder mit reiner Luft (Placebo) exponiert. An den folgenden drei Tagen kommen die Patienten ins Fraunhofer-Institut, um ihr Hautbild bewerten zu lassen.

Falls die Studie zeigt, dass Gräserpollenexpositionen in der Fraunhofer ECC zu einer signifikanten Verschlechterung des Hautbildes bei Neurodermitikern führen, kann neben der wissenschaftlichen Beweisführung diese kontrollierte Verschlechterung des Hautbildes als Modell genutzt werden, um neue Medikamente gegen Neurodermitis auf Wirksamkeit und Sicherheit zu prüfen.



KONTAKT

Dr. Philipp Badorrek
Telefon +49 511 5350-681
philipp.badorrek@item.fraunhofer.de

Geschäftsfeld 2

PROJEKTÜBERSICHT

Untersuchungen zur Sicherheit und Wirksamkeit eines pflanzlichen Präparats bei Patienten mit Heuschnupfen in der Fraunhofer Environmental Challenge Chamber

Untersuchungen zur Sicherheit und Wirksamkeit inhalativ verabreichter Bronchodilatoren bei Patienten mit COPD

Untersuchungen zur Sicherheit und Wirksamkeit eines Chemokin-Antagonisten bei Patienten mit COPD durch endobronchiale Endotoxinprovokation

Charakterisierung von Partikeln in der Ausatemluft von Patienten mit Asthma und COPD

Bronchoskopische Gewinnung von Entzündungszellen aus den Atemwegen von Patienten mit Asthma

Entzündungsmonitoring der Lunge nach segmentaler Allergenprovokation mittels Kernspintomographie

Untersuchungen zur Wirksamkeit eines entzündungshemmenden Präparats bei Patienten mit Asthma

Untersuchung des Einflusses der Gravitation auf den exhalierten Anzahlstrom von in der Lunge generierten endogenen Aerosolpartikeln

Weiterentwicklung eines Systems zur Aerosolisierung und kontrollierten inhalativen Applikation von Lungensurfactant

Etablierung einer universellen Methode zur inhalativen Provokation von Probanden gegenüber Umwelt- und Innenraumallergenen

Untersuchung des Einflusses von Gräserpollen auf die Auslösung von Hautveränderungen bei Patienten mit Neurodermitis

Untersuchung von nicht-kodierender RNA als Biomarker bei Patienten mit COPD

Etablierung der niedrig dosierten inhalativen Endotoxinprovokation als Modell für die Medikamentenprüfung

3



GEWERBE-, UMWELTTOXIKOLOGIE UND VERBRAUCHERSCHUTZ

Projektberichte

Analytische Methoden für die Risikobewertung
von 3-MCPD- und Glycidyl-Ester

Entwicklung und Erprobung von einfachen
Tests zur Bewertung der Exposition und der
Lungentoxizität von Consumer-Sprays

Effekte von inhalierten Titandioxid-Nano- und
-Feinpartikeln auf die Lunge von Ratten

Projektübersicht



Im Geschäftsfeld Gewerbe-, Umwelttoxikologie und Verbraucherschutz werden Chemikalien, Partikel, einschließlich Nanopartikel, und komplexe Gemische untersucht, wie sie am Arbeitsplatz, in der Umwelt und in Verbraucherprodukten auftreten. Profunde Kenntnisse in der Inhalationstoxikologie, der Aerosolverfahrenstechnik, der chemischen Analytik und der toxikologischen Pathologie zeichnen dieses Geschäftsfeld aus. Die notwendigen Untersuchungen werden am Fraunhofer ITEM in Übereinstimmung mit nationalen und internationalen Prüfvorschriften sowie nach den Grundsätzen der »Good Laboratory Practice« (GLP) durchgeführt.

Für die Registrierung von Stoffen ist eine Vielzahl von gesetzlichen Auflagen zu berücksichtigen, die das Einführen neuer Produkte sowie Nachuntersuchungen von Altstoffen regeln. In vielen Fällen besteht der Bedarf, neue Produkte oder Produktionsverfahren zu untersuchen oder generell die Belastung von Innenräumen durch Schadstoffe zu prüfen. In diesem Zusammenhang bildet die Entwicklung neuer Verfahren zur Messung von luft-



getragenen Schadstoffen bzw. deren Quellstärken einen weiteren Forschungsschwerpunkt. Physikalisch-chemische und biologische Modelle helfen, Wirkstoffe und deren Freisetzung aus Baumaterialien, Innenausstattungen und Verbraucherprodukten zu ermitteln. Weiterhin werden am Fraunhofer ITEM mathematische Simulationsmodelle zur Expositionsabschätzung entwickelt.

Immunologische Tests erfassen sensibilisierende und immunmodulierende Wirkungen. Ein mögliches irritatives Potenzial von Chemikalien und Umweltschadstoffen auf die Atemwege wird mit Hilfe von verschiedenen validierten In-vitro-Modellen und gegebenenfalls Tiermodellen festgestellt. Umfangreiche In-vitro-Testverfahren stehen als Screening-Methoden und zur Abschätzung des gentoxischen Potenzials zur Verfügung. Diese Tests reduzieren die Zahl der Tierversuche. In den »Environmental Challenge Chambers« der klinischen Einheit des Instituts werden für spezifische Fragestellungen zur Umwelt- und Arbeitsplatztoxikologie auch Probandenstudien durchgeführt.

KONTAKT



Prof. Dr. Clemens Dasenbrock
Telefon +49 511 5350-408
clemens.dasenbrock@
item.fraunhofer.de



Prof. Dr. Wolfgang Koch
Telefon +49 511 5350-117
wolfgang.koch@item.fraunhofer.de

Projektbericht

ANALYTISCHE METHODEN FÜR DIE RISIKOBEWERTUNG VON 3-MCPD- UND GLYCIDYL-ESTER

ZUSAMMENFASSUNG

Freies und estergebundenes 3-Monochlorpropandiol (3-MCPD) sowie Glycidyl-Fettsäureester sind seit langem als bedenkliche Kontaminanten in verschiedenen Lebensmitteln wie raffinierten Pflanzenölen bekannt. Um die Risiken für die Gesundheit des Menschen abschätzen zu können, führt das Fraunhofer ITEM im Auftrag von Verbraucherschutzbehörden zwei tierexperimentelle Studien durch. Als Voraussetzung für diese Studien haben Chemiker am Institut die chemisch-analytischen Methoden zur Bestimmung von freiem und gebundenem 3-MCPD in verschiedenen biologischen Matrices – in Blut, Urin, Fett, Niere, Leber und Darm – entwickelt und validiert. Außerdem konnten sie ein Verfahren etablieren, um freigesetztes Glycidol nachzuweisen.

In den letzten Jahren häuften sich die Berichte über das Vorkommen von 3-Monochlorpropandiol- (3-MCPD-) und Glycidyl-Fettsäureestern in Lebensmitteln und in raffinierten Pflanzenölen, insbesondere in Palmölen. Um die Exposition der Bevölkerung mit diesen Kontaminanten abschätzen zu können, benötigen Verbraucherschutzbehörden Daten zu deren Bioverfügbarkeit als Basis für eine Risikobewertung. Bei Glycidol, einem möglichen Spaltprodukt von Glycidyl-Fettsäureestern, handelt es sich um ein gentoxisches Kanzerogen.

In welchem Ausmaß 3-MCPD- bzw. Glycidyl-Fettsäureester nach oraler Aufnahme im Organismus zu 3-MCPD bzw. Glycidol hydrolysiert werden, wird im Rahmen zweier tierexperimenteller Studien am Fraunhofer ITEM im Auftrag des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) in fachlicher Abstimmung mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) untersucht.

Zum Studienbeginn waren keine analytischen Verfahren zur Bestimmung von 3-MCPD bzw. 3-MCPD-Estern in Körperflüssigkeiten (Blut, Urin), Organen (Leber, Niere) und Geweben (Fett) sowie Darminhalten bekannt. Als Voraussetzung zur Durchführung der Studien war es daher notwendig, sehr sensitive und selektive Methoden zur Bestimmung von 3-MCPD und 3-MCPD-Estern in den betreffenden biologischen Matrices zu entwickeln. Weiterhin war geplant, eine Methodik zur Bestimmung des N-terminalen Valin-Adduktes im Hämoglobin



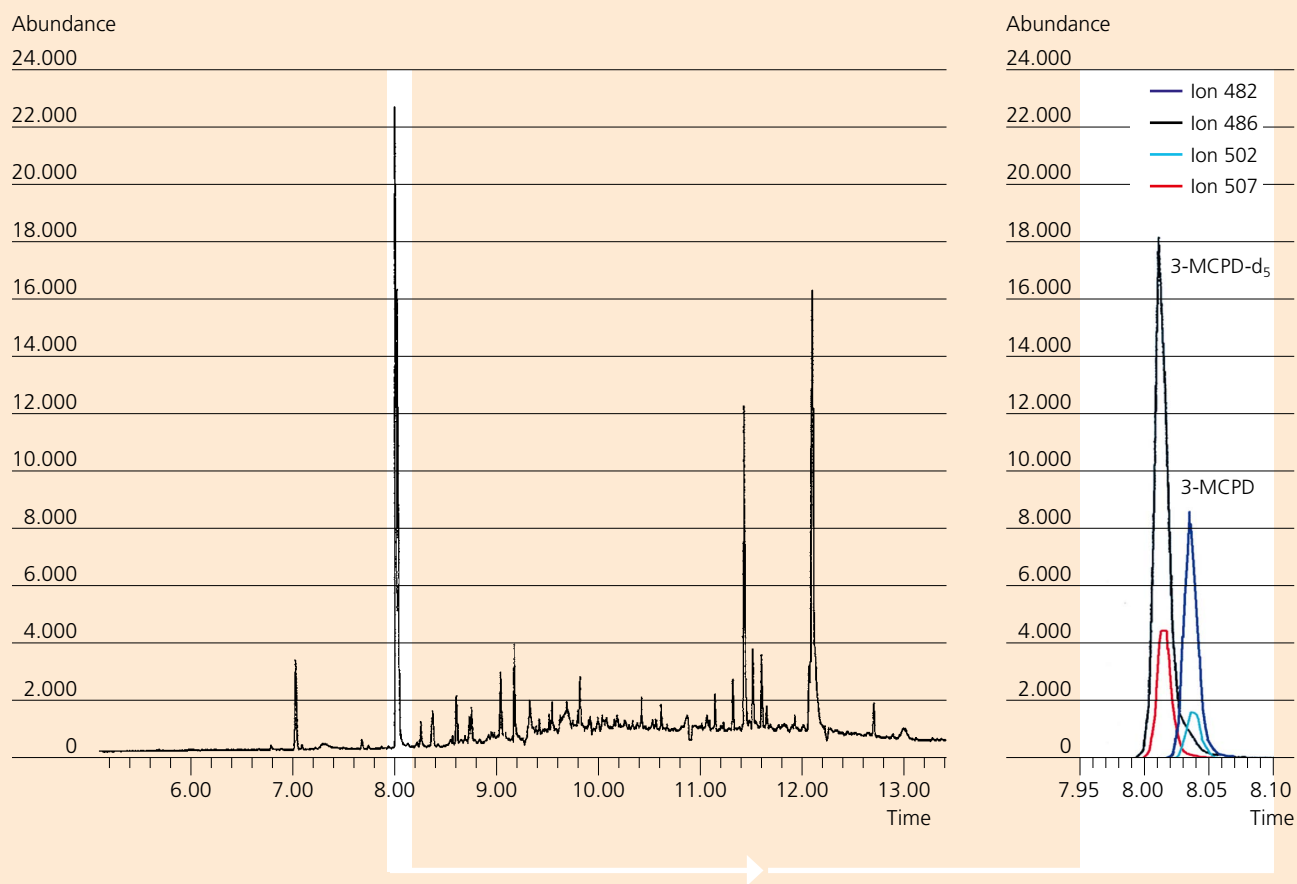
(N-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin) als möglichen Biomarker für eine Glycidolexposition zu etablieren.

Freies 3-MCPD in Blut, Urin und Organen

Die Proben wurden mit Silicagel 60 verrieben und mit dem internen Standard (3-MCPD- d_5) versetzt. Mit Hilfe der anschließenden Säulenchromatographie wurden Matrixbestand-

teile entfernt und der Analyt angereichert. Nach Elution mit Ethylacetat wurde das 3-MCPD derivatisiert. Zur Analyse (Abb. 1) des Heptafluorbuttersäure-Derivats von 3-MCPD wurde die GC/NCI-MS-Methode verwendet (Kapillargaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie im negativ-chemischen Ionisationsmodus). Die quantitative Bestimmung erfolgte über eine interne Kalibrierung in der jeweiligen Matrix.

Abb. 1: Chromatogramm einer Rattenblutprobe nach Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor im negativ-chemischen Ionisationsmodus.



3-MCPD und 3-MCPD-Ester in Organen und Darminhalten

Die Proben wurden homogenisiert und mit tertiärem Butylmethylether extrahiert. Der Extrakt sowie der Probenrückstand wurden mit einer NaCl-Lösung ausgeschüttelt, um vorhandenes freies 3-MCPD abzutrennen. Das freie 3-MCPD wurde zum Phenylboronsäure-Derivat umgesetzt und nach anschließender Extraktion analysiert. Die Hydrolyse des 3-MCPD-Esters im tertiär-Butylmethylether-Extrakt erfolgte mit einer methanolischen Natriummethylat-Lösung, die sich daran anschließende Derivatisierung des freigesetzten 3-MCPD wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Zur Analyse des Derivats von 3-MCPD wurde die GC/EI-MS-Methode verwendet. Die quantitative Bestimmung erfolgte über eine Kalibrierung in der jeweiligen Matrix mit den internen Standards 3-MCPD-d₅ und 1,2 Dipalmitoyl-3-Chlor-1,2-Propanediol-d₅.

N-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin in Rattenblut

Die Erythrozyten wurden vom Vollblut abgetrennt und lysiert. Anschließend wurde das Globin ausgefällt. Das alkylierte N-terminale Valin wurde nach Zusatz eines synthetisierten Dipeptid-Anilids als internem Standard mit Pentafluorphenylisothiocyanat derivatisiert und durch einen modifizierten Edman-Abbau abgespalten. Das Produkt wurde extrahiert und derivatisiert. Zur Analyse des acetylierten Derivats von N-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin wurde die GC/NCI-MS als Methode eingesetzt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über eine interne Kalibrierung in gepooltem Rattenglobin.

Erfolgreicher Einsatz validierter Analysemethoden

Die validierten Methoden werden derzeit erfolgreich in den laufenden Projekten angewendet. Durch den Einsatz dieser neuen Methoden ist es möglich, sehr geringe Konzentrationen

an freiem 3-MCPD bis ng/ml bzw. ng/g zu bestimmen. Im Tierversuch können jetzt bis zu 0,01 % der verabreichten Dosis ermittelt werden – erst dieses ermöglicht Aussagen zur Verteilung im Organismus und erlaubt schließlich die Risikoabschätzung dieser Verbindung.



KONTAKT

Dr. Edith Berger-Preiß
Telefon +49 511 5350-213
edith.berger-preiss@item.fraunhofer.de

ENTWICKLUNG UND ERPROBUNG VON EINFACHEN TESTS ZUR BEWERTUNG DER EXPOSITION UND DER LUNGENTOXIZITÄT VON CONSUMER-SPRAYS

ZUSAMMENFASSUNG

Die Anwendung von Sprays, insbesondere von Sprays in Druckgasdosen, führt bei Verbrauchern immer wieder zu zum Teil schweren Gesundheitsbeeinträchtigungen. Speziell bei der Anwendung von Imprägniersprays sind wiederholt Fälle von schweren akuten Lungenschädigungen bekannt geworden. Sowohl bei Rohstoffherstellern und Abfüllern als auch bei den Verantwortlichen für den Verbraucherschutz besteht Bedarf an einer anwendungsnahen Bewertung des Gesundheitsrisikos beim Umgang mit den Sprayprodukten vor ihrer Inverkehrbringung. Wissenschaftler des Fraunhofer ITEM haben eine ganzheitliche Strategie zum Screening von Sprays oberflächenaktiver Substanzen entwickelt. Diese besteht aus der anwendungsbezogenen Bewertung des inhalativen Expositionspotenzials des Sprays und einer ersten Einschätzung der akuten Lungentoxizität unter Verwendung der isoliert perfundierten Lunge (IPL) der Ratte. Durch Anwendung des Screening-Verfahrens können in Zukunft akute Inhalationsstudien am Versuchstier im Sinne des so genannten »3-R-Konzepts« (replace, reduce, refine) vermieden werden.

Charakterisierung der Exposition

Die Charakterisierung der Exposition erfolgt durch Messung des lungengängigen Anteils der in die Raumluft freigesetzten Aerosole. Für diese Messungen wird das Versprühen des Sprays so simuliert, wie es der gängigen Anwendung entspricht. So werden auch expositionsrelevante Bedingungen berücksichtigt, z. B. die Alterung (Verdampfung) der Tröpfchen. Damit kann das Expositionspotenzial des Sprühnebels bewertet werden, wobei alle expositionsrelevanten Aspekte einbezogen werden. Dies steht im Gegensatz zur bisher angewendeten Praxis, bei der lediglich das primäre Tropfenspektrum des Sprays direkt an der Sprühdüse charakterisiert wird.

Testung auf akute Lungentoxizität

Bei dem IPL-Test wird die isoliert perfundierte und kontrolliert ventilierte Rattenlunge nach einem standardisierten Vernebelungsprotokoll mit einem gealterten Aerosol der Sprühformulierung behandelt. Die inhalierte Dosis wird bestimmt und die Änderungen verschiedener kontinuierlich gemessener Atemparameter wie Compliance und Resistance sowie eine Ödem- oder Atelektasenbildung (Verklebung der Lungenbläschen infolge der Beschädigung der Surfactantschicht) ausgewertet (Versuchsaufbau siehe Abb. 1). Die Endpunkte erlauben die Bewertung der akuten Lungentoxizität, zurückzuführen auf

eine Funktionsbeeinträchtigung der Surfactantschicht des Lungenepithels durch die Wechselwirkung mit der deponierten oberflächenaktiven Substanz.

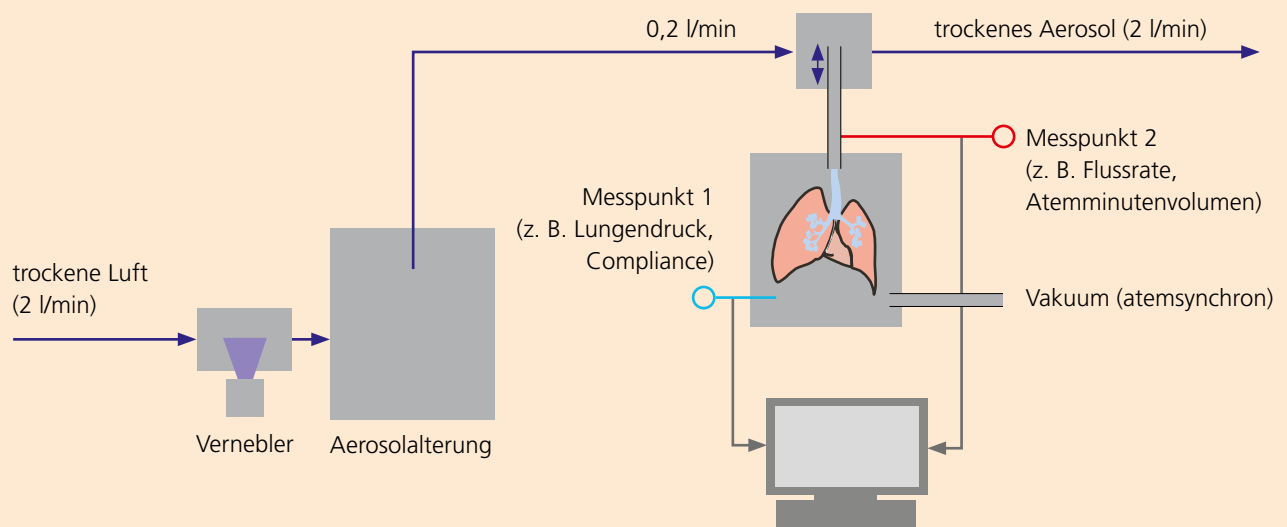
Ergebnisse

Die Untersuchung von zehn gebrauchsfertigen Sprühprodukten ermöglichte eine klare Differenzierung des Expositionspotenzials in Abhängigkeit von der verwendeten Sprühtechnologie. Treibgassprays schnitten dabei am schlechtesten ab. Hier wurde bezogen auf die verbrauchte Produktmenge der höchste Anteil an lungengängigen Partikeln freigesetzt. Bei Verwendung von Pumpsprays oder Sprühschaumformulierungen war das Expositionspotenzial bis zu zwei Größenordnungen

gen niedriger. Diese deutlichen Unterschiede konnten mit dem parallel angewendeten Guideline-Verfahren nicht erkannt werden.

Die Auswertung des Lungentests zeigte für sieben untersuchte Substanzen signifikante Unterschiede in der Änderung der Parameter Atemzugvolumen, Compliance und Resistance im Vergleich zur Kontrolle. Die makroskopischen Veränderungen variierten je nach Substanz von partiell kollabierten Lungenarealen bis hin zur vollständigen Atelektase der gesamten Lunge. Dies war in qualitativer Übereinstimmung mit vorliegenden In-vivo-Daten. Bei einer Substanz wurden in der isoliert perfundierten Lunge zusätzlich mittel- bis hochgradige Lungenödeme festgestellt. Diese waren sowohl bei den durchgeführten In-vivo-

Abb. 1: Für die Untersuchung der akuten Lungentoxizität wenden Wissenschaftler am Fraunhofer ITEM eine neue Strategie an: Sie optimieren das Expositionsverfahren und testen das freigesetzte Aerosol an der isoliert perfundierten Rattenlunge. Schematisch ist hier der Versuchsaufbau dargestellt.





Versuchen als auch bei einer unter Verbrauchern aufgetretenen Vergiftungsserie nach Anwendung dieser Substanz diagnostiziert worden. Bei den verbliebenen drei Substanzen zeigten sich hingegen keine Abweichungen der Atemparameter und auch makroskopisch waren keine Hinweise auf Ödem- oder Atelektasenbildungen im Vergleich zu den Kontrollen nachweisbar. Die Ergebnisse aus den In-vivo-Versuchen waren ebenfalls unauffällig. Insgesamt korrelieren die Befunde aus den IPL-Untersuchungen und aus den In-vivo-Studien sehr gut.

Schlussfolgerung

Die beiden vorgestellten Verfahren – das Expositionsverfahren und der Test mit der isoliert perfundierten Lunge – können dazu beitragen, das Gesundheitsrisiko beim Umgang mit Imprägniersprays zu minimieren. Zum einen wird dem Inverkehrbringer ein verlässliches Werkzeug für die Optimierung der Sprühtechnologie im Hinblick auf ein möglichst geringes Expositions potenzial an die Hand gegeben. Zum anderen zeigen die Ergebnisse und insbesondere der Vergleich der Ergebnisse mit den entsprechenden tierexperimentellen Studien, dass ein Screening auf akut inhalationstoxische Substanzen mit der isoliert perfundierten Lunge möglich ist. In Zukunft könnte die Testung an der isolierten Lunge einer Substanzprüfung am lebenden Tier vorgeschaltet werden, um akut lungentoxische Formulierungen schon im Vorfeld zu erkennen und zu verwerfen.



KONTAKT

Dr. Monika Fischer
Telefon +49 511 5350-409
monika.fischer@item.fraunhofer.de

Projektbericht

EFFEKTE VON INHALIERTEN TITANDIOXID-NANO- UND -FEINPARTIKELN AUF DIE LUNGE VON RATTEN

ZUSAMMENFASSUNG

In einer Inhalationsstudie an Ratten zeigte sich, dass sich TiO₂-Nano- und -Feinpartikel in ihren induzierten Effekten, dem Translokationsverhalten und der Deposition stark ähneln. Beide Partikeltypen rufen nur geringe entzündliche Veränderungen der Lunge hervor. Eine Ablagerung findet vor allem in Alveolarmakrophagen und in Typ-I-Pneumozysten statt.

Titandioxid (TiO₂) wird als weißes Pigment verwendet. Es besitzt ein geringes toxisches Potenzial und wird häufig als Vergleichssubstanz in Inhalationsstudien eingesetzt. Partikel mit einem Durchmesser über 0,1 µm (100 nm) bezeichnet man generell als Feinpartikel, kleinere Partikel als Nanopartikel. Letztere können aufgrund ihrer geringen Größe nach Inhalation tief in der Lunge abgelagert werden und nicht nur in Zellen gelangen, sondern auch in deren Zellkerne und -organellen. Um eventuell vorhandene Unterschiede in der Ablagerung und im Translokationsverhalten von TiO₂-Nano- und -Feinpartikeln nachzuweisen, haben die Wissenschaftler einen dreiwöchigen Inhalationsversuch an weiblichen Ratten durchgeführt.

Die Tiere wurden täglich für sechs Stunden mit TiO₂ in zwei unterschiedlichen Größen (fein und nano) oder mit Reinluft als Kontrolle exponiert und hatten postexpositionelle Erholungszeiten von 3, 28 oder 90 Tagen. Das Lungengewebe wurde anschließend mittels Elektronenmikroskopie, Histologie und zur Quantifizierung der Deposition (relativer Depositionsindex, RDI) und der Volumenanteile der Lunge mit stereologischen Methoden untersucht.



Partikelagglomerate vor allem in Alveolarmakrophagen und in Typ-I-Pneumozyten

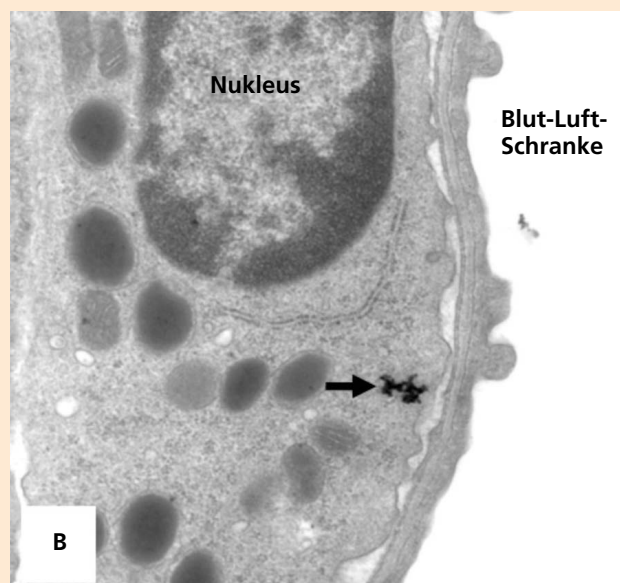
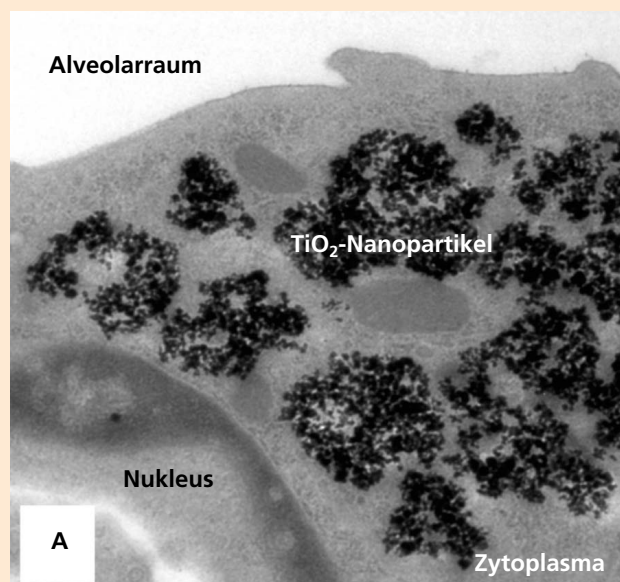
Bei Tieren, die mit Nano- und Feinpartikeln behandelt wurden, war eine minimale Infiltration von Entzündungszellen, hauptsächlich mit Alveolarmakrophagen, vorhanden. Ultrastrukturell zeigte sich eine deutlich dominierende Ablagerung von Partikelagglomeraten beider Größen intrazytoplasmatisch in Alveolarmakrophagen (Abb. 1 A) sowie in geringerem Ausmaß in Typ-I-Pneumozyten. Dies bestätigte sich statistisch signifikant bei Ermittlung des RDI für die Ablagerung in Alveolarmakrophagen. Der RDI der Typ-I-Pneumozyten zeigte lediglich einen deutlichen Trend, jedoch keine statistische Signifikanz. Dies war der erste Versuch mit TiO_2 -Partikeln, bei dem direkt eine Bestimmung des RDI durchgeführt wurde.

Nano- und Feinpartikelagglomerate waren vereinzelt außerdem in Bronchialepithel, Lungeninterstitium und Kapillarendothelzellen vorhanden. In einem intrakapillär gelegenen Granulozyten konnten intrazytoplasmatisch Nanopartikel nachgewiesen werden, was bisher noch nicht beschrieben wurde (Abb. 1 B).

Weder im Zellkern noch in Zellorganellen waren bei diesem Versuch Partikelablagerungen vorhanden. Ebenso zeigten sich keine strukturellen Veränderungen der Zellorganellen. Deutliche Unterschiede der Effekte und der Partikeldeposition bzw. -translokation waren zwischen Nano- und Feinpartikel-Gruppen nicht vorhanden.

Die Zusammensetzung des Lungenparenchyms, d. h. der Anteil verschiedener Gewebe am Lungenvolumen, wurde ebenfalls ermittelt. Hierbei zeigten sich zwischen Kontroll- und Expositionsgruppen keine deutlichen, über eine längere Zeit anhaltenden Veränderungen.

Abb. 1: TiO_2 -Nanopartikel in einem Alveolarmakrophagen (A) und im Zytoplasma (Pfeil) eines intrakapillär liegenden Granulozyten (B). Letzteres wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.



Partikeltranslokation ist abhängig von Partikelagglomeration

Obwohl die Ratte als Versuchstierspezies gewählt wurde, die ein proinflammatorisches Lungenmilieu aufweist und somit sensibler für Schädigungen durch Partikel ist, wurden keine schwerwiegenden Schädigungen der Lunge, keine signifikanten Unterschiede im Translokationsverhalten und keine subzellulären Veränderungen durch die Inhalation von TiO₂-Nano- und -Feinpartikeln festgestellt. Allerdings neigen Nanopartikel zu einer starken Agglomeration mit Bildung größerer Sekundärpartikel. Der Hauptanteil der in diesem Versuch applizierten Nanopartikel wies jedoch trotz vorheriger Ultraschallbehandlung eine Größe über 0,1 µm auf, was zu einer Verminderung des toxischen Potenzials geführt haben könnte. Trotzdem konnten Nanopartikel in einer intrakapillären Zelle sowie im Kapillarendothel nachgewiesen werden. Daher ist eine hämatogene Translokation der nicht agglomerierten Nanopartikel in andere Körperregionen in Betracht zu ziehen.

Die hier angewandte Elektronenmikroskopie und die stereologischen Auswertungsmethoden geben detaillierte Einblicke in das Translokationsverhalten, die Morphologie von Nano- und Feinpartikeln und liefern quantitative Informationen über die Zusammensetzung des Lungengewebes.

Diese Untersuchungen wurden im Rahmen der Dissertation von Maja Eydner am Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover in Kooperation mit dem Fraunhofer ITEM durchgeführt.



KONTAKT

Priv.-Doz. Dr. Susanne Rittinghausen
Telefon +49 511 5350-310
susanne.rittinghausen@item.fraunhofer.de

Geschäftsfeld 3

PROJEKTÜBERSICHT

Aerosoltechnik

Entwicklung eines kontinuierlichen Verfahrens zur Herstellung von Kalibrier aerosolen im ultrafeinen Partikelgrößenbereich

Charakterisierung der Exposition bei Verwendung kosmetischer Sprays und Sprays zur Beschichtung von Oberflächen

Entwicklung und Bau eines Generators zur Herstellung eines Aerosols aus Kohlenstoffnanofasern

Entwicklung und Validierung eines Screeningverfahrens für oberflächenaktive Substanzen hinsichtlich ihrer lungentoxischen Eigenschaften

Messverfahren zur Überwachung von Dieselöldämpfen und -aerosolen am Arbeitsplatz

Löslichkeitsuntersuchungen zu Nanosilizium

Untersuchungen zu Schutzmaßnahmen von Einsatzpersonal in radiologischen Notfällen

Bereitstellung aerosoltechnischer Expertise und Anlagen für Bau und Betrieb einer Aerosolkammer für Mikroorganismen

Bereitstellung aerosoltechnischer Expertise und Anlagen für die Exposition von Hunden gegenüber aerosolisierten Wirkstoffen

Bestimmung der Freisetzung luftgetragener und lungengängiger Partikel bei der Fragmentierung sprödbrechender Materialien

Allgemeine und Reproduktionstoxikologie

Einfluss niederfrequenter elektromagnetischer Felder auf das sich entwickelnde blutbildende System, das Immunsystem und das ZNS in vivo

Bio- und Umweltanalytik

Chemische Charakterisierung von Erdölprodukten (Kraftstoffe und Schmiermittel)

Charakterisierung der Zusammensetzung von Biozidprodukten (Stoffgemischen)

Untersuchung zur Freisetzung von Formaldehyd aus Formaldehyddotpotverbindungen

Untersuchungen zur Bestimmung der inhalativen und dermalen Exposition bei Anwendung von biozidhaltigen Produkten an Arbeitsplätzen und im häuslichen Umfeld

Entwicklung von validierten Methoden zum Biomonitoring ausgewählter Metaboliten

Bestimmung von 3-MCPD in Körperflüssigkeiten und Organen

Bestimmung von Hämoglobin-Addukten

Konzentrationsbestimmung von Pharmaka in Expositionsatmosphären und Formulierungen

Entwicklung von Methoden zur Non-Target-Analytik komplexer Gemische

Statistische Auswertung quantitativer NMR/MS-Daten zur Klassifizierung zustandsabhängiger Metabolitenmuster

Strukturaufklärung von Verunreinigungen und Abbauprodukten in Pharmaka mittels LC-NMR- und LC-MS-Untersuchungen

Begleitende analytische Untersuchungen zu In-vitro-Expositionsstudien mit Gasen

Bestimmung spezifischer anorganischer Tracer für die Erstellung von Ausbreitungs- und Verteilungsmodellen

Gehaltsbestimmung toxischer Elemente in Verbraucherprodukten

Bestimmung von Elementen in Organen und Körperflüssigkeiten im Rahmen von Studien zur Wirkung von Nanopartikeln

Datenbanken und Informationssysteme

RITA – Registry of Industrial Toxicology Animal-data

CEPA – Cell Proliferation and Apoptosis

goRENI INHAND – International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic criteria

Wissenschaftliche Fortentwicklung des Projekts DevTox

Genetische Toxikologie

Gentoxikologische Guidelinestudien im Rahmen toxikologischer Prüfungen von Chemikalien

In-vitro- und in-vivo-Untersuchungen zu möglichen gentoxischen Effekten von elektromagnetischen Feldern im Radiofrequenzbereich

Comet-Assay-basierte Beurteilung der Gentoxizität von quarzhaltigen Keramikfasern

Mechanistische Untersuchungen zur Gentoxizität von Nitrostyrolderivaten unter besonderer Berücksichtigung der Topoisomerase-II-Aktivität

Untersuchungen zur In-vitro- und In-vivo-Gentoxizität von innovativen Arzneimitteln

Untersuchungen zur In-vitro- und In-vivo-Gentoxizität von SiO₂-Nanopartikeln

Etablierung von Zellmodellen und Optimierung von In-vitro-Methoden zur Beurteilung der Toxizität und Gentoxizität von Carbon Nanotubes

Etablierung des In-vivo-Comet-Assays mit den Organen Lunge und Leber der Ratte

Inhalationstoxikologie

Sichtung von Fasermaterialien zur Auftrennung in verschiedene atembare Fraktionen

Untersuchung der In-vivo-Löslichkeit von glasartigen Faserstäuben

Studien zur Bewertung der Lungentoxizität von Tonerpulvern und Tonerhilfsstoffen

Studie an Ratten zur Toxikokinetik nach Inhalation von nanoskaligen schwerlöslichen Partikeln

Dispersion und Retention von Stäuben mit ultrafeinen Primärpartikeln in der Lunge

Vergleich dreier Nano-Titan-dioxide mit verschiedener Oberflächencharakteristik im 28-Tage-Inhalationstest

Entwicklung von Screening-Verfahren zur Untersuchung eines möglichen kanzerogenen Potenzials von Carbon Nanotubes

Studie an Ratten zur Toxikokinetik nach Inhalation von Carbon Nanotubes

In-vitro-Toxikologie

Entwicklung eines biologischen Detektors für inhalative Prüfgegenstände

In-situ-Analyse zellulärer Wirkungen von luftgetragenen Substanzen und Wirkstoffen in vitro

Erweiterte Prävalidierung der Air/Liquid-Interface-Technologie (ALI) als Prüfmethode für inhalative Substanzen (Gase) im Rahmen einer Ringstudie unter Beteiligung von behördlichen Laboren

Herstellung komplexer Zellkulturmodelle für den Einsatz in Air/Liquid-Interface-Prüfverfahren

Etablierung eines Ames-Tests für flüchtige organische Verbindungen (VOC)

Studien zur Untersuchung der biologischen Wirkung von inhalativ aufgenommenen Substanzen an Zellen des Respirationstrakts

Klinische Chemie und ADME

Hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungen im Rahmen von toxikologischen Prüfungen

Untersuchung der dermalen Aufnahme von Zinkoxid-Nanopartikeln

Untersuchung der Toxikokinetik von radioaktiv markiertem Glycidylpalmitat

Untersuchung von Entzündungsparametern und oxidativem Stress in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit der Ratte

Messung von Vitalitätsparametern (LDH, Harnstoff) in Zellkulturüberständen

Screening-Untersuchungen an humanen Zelllinien aus unterschiedlichen Abschnitten des Respirationstrakts zur Toxizität von Carbon-Black-Nanopartikeln

Pathologie

Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Translokation von Goldnanopartikeln in das ZNS

Elektronenmikroskopische Untersuchung zum Nachweis von inhalierten bzw. instillierten Nanopartikeln im Respirationstrakt

Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Translokation von feinen und nanoskaligen Titandioxid-Partikeln von der Nase zum Gehirn

Einfluss niederfrequenter elektromagnetischer Felder auf das sich entwickelnde blutbildende System, das Immunsystem und das ZNS bei der Maus

Gentoxische Wirkmechanismen von feinen und ultrafeinen Stäuben in der Lunge

Histologische, immunhistochemische und morphometrische Untersuchungen zur Wirkung von verschiedenen Fasertypen auf Peritonealzellen

Pathogenetische und immunbiologische Untersuchungen zur Staubkanzerogenität

Pathologie-Datenbank RITA (Registry of Industrial Toxicology Animal-data) in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Datenbanken und Informationssysteme

Zellproliferationsuntersuchungen im Respirationstrakt nach Inhalation von verschiedenen Fasertypen

Zelluläre und subzelluläre Effekte an Epithelzellen der Rattenlunge nach Inhalation von feinen und nanoskaligen Titandioxid-Partikeln

Histologische, immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur intraperitonealen Wirkung von Carbon Nanotubes

4



PRÜFUNG UND REGISTRIERUNG VON CHEMIKALIEN, BIOZIDEN UND PFLANZENSCHUTZMITTELN



Projektberichte

Faktoren für die Zeitextrapolation bei Studien mit
wiederholter Verabreichung

Vergleich der Methoden zur Ableitung von
Grenzwerten für Chemikalien

Projektübersicht

>>

In dem Geschäftsfeld Prüfung und Registrierung von Chemikalien, Bioziden und Pflanzenschutzmitteln konzentriert sich die langjährige Erfahrung und die umfassende Expertise in der Risikobewertung. Diese beinhaltet die Toxikologie und Ökotoxikologie sowie die Abschätzung der Exposition und des Verhaltens in der Umwelt.

Für zahlreiche Stoffe sind neben den bereits vorliegenden Daten weitere Prüfungen erforderlich, um eine Risikobewertung zu ermöglichen. Auch durch die seit 2007 bestehende EU-Verordnung REACH werden zahlreiche Nachuntersuchungen von Altstoffen notwendig. Die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter dieses Geschäftsfelds sichten und bewerten die vorliegenden Daten und empfehlen gegebenenfalls zusätzliche Untersuchungen zu dem betreffenden Stoff. Um Datenlücken zu schließen, werden am Fraunhofer ITEM Prüfungen zu den folgenden Endpunkten durchgeführt: Toxikokinetik, Sensibilisierung, Immuntoxizität, subchronische und chronische Toxizität, Reproduktionstoxizität, Teratogenität, Kanzerogenität und Mutagenität. Außerdem können Fragen zum Wirkmechanismus von Chemikalien geklärt werden.



Das Fraunhofer ITEM arbeitet je nach Bedarf eng mit verschiedenen Fraunhofer-Instituten und anderen Auftragsforschungsinstituten zusammen. Somit können alle für die gesetzlich vorgeschriebene Risikobewertung geforderten Daten, physiko-chemische Eigenschaften und Ökotoxizität eingeschlossen, aus einer Hand geliefert und die Gesamtbewertung sowie Registrierungsdossiers erstellt werden. Alle Gutachten werden unter der Einhaltung hoher Standards angefertigt.

Die gesetzlichen Bestimmungen, insbesondere die Kriterien für die Risikobewertung, sind einem ständigen Wandel unterworfen. Durch die Zusammenarbeit mit nationalen und internationalen Gremien und Behörden sowie die Teilnahme an Ringversuchen ist das Fraunhofer ITEM an der Entwicklung von Richtlinien beteiligt und kann unmittelbar auf veränderte Randbedingungen reagieren; davon profitieren in besonderem Maße auch unsere Kunden. Es ist absehbar, dass der Bedarf an Risikobewertungen und ergänzenden toxikologischen Untersuchungen für Chemikalien weiter steigen wird. Die Stoffbewertung im Rahmen der REACH-Verordnung ist eine der Herausforderungen der kommenden Jahre. Daher werden die Kompetenzen in diesem Geschäftsfeld stetig weiter ausgebaut.

KONTAKT



Dr. Inge Mangelsdorf
Telefon +49 511 5350-303
inge.mangelsdorf@item.fraunhofer.de



Dr. Jochen Buschmann
Telefon +49 511 5350-462
jochen.buschmann@item.fraunhofer.de

Projektbericht

FAKTOREN FÜR DIE ZEITEXTRAPOLATION BEI STUDIEN MIT WIEDERHOLTER VERABREICHUNG

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Risikobewertung von Chemikalien wird die Tatsache berücksichtigt, dass die Wirkschwelle einer Chemikalie umso niedriger ist, je länger man ihr ausgesetzt ist. Liegen lediglich tierexperimentelle Kurzzeitstudien vor, aber keine Langzeitstudien, erfolgt eine Zeitextrapolation. Das heißt, die Wirkschwelle für eine Langzeitexposition wird basierend auf einer Kurzzeitstudie mit Hilfe eines Faktors ermittelt. Wissenschaftler am Fraunhofer ITEM haben Faktoren auf einer breiteren Datenbasis als bisher ermittelt und vor allem den Einfluss von Unterschieden im Studiendesign untersucht und verringert. Sie haben schließlich Faktoren abgeleitet, indem sie nur die Unterschiede in der zeitlichen Entwicklung der Wirkschwelle berücksichtigt haben.

Im Alltag kommt der Mensch unwillkürlich mit einer Vielzahl unterschiedlicher Chemikalien in Berührung, sei es bei entsprechender beruflicher Tätigkeit oder auch zu Hause. Der Kontakt mit chemischen Produkten erfolgt häufig über längere Zeiträume und immer wiederkehrend und sollte ohne gesundheitliche Folgen bleiben. Bei der Risikobewertung von Chemikalien müssen diese chronischen Expositionen berücksichtigt werden. Im Normalfall beruht eine solche Risikobewertung auf einer Studie an Tieren, aus der eine Wirkschwelle für die Chemikalie abgeleitet werden kann, denn Daten zur Wirkschwelle am Menschen liegen in der Regel nicht vor. Diese Tierdaten müssen auf die Situation beim Menschen übertragen, also extrapoliert werden. Bei dieser Extrapolation müssen nicht nur die Unterschiede zwischen den Spezies (Tier/Mensch) berücksichtigt werden, sondern auch die Unterschiede zwischen der Studiendauer am Tier und der Expositionsdauer beim Menschen. Die Habersche Regel besagt, dass das Ausmaß vieler gesundheitlicher Schäden ein Produkt aus Chemikalienkonzentration und Expositionsdauer ist, d. h. je länger man einer Chemikalie ausgesetzt ist, desto niedriger ist ihre Wirkschwelle. Diese Tatsache wird bei einer Zeitextrapolation berücksichtigt, indem die Wirkschwelle für eine Langzeitexposition basierend auf einer Kurzzeitstudie mit Hilfe eines Faktors ermittelt wird. Gerade für viele Chemikalien, die bereits seit langer Zeit auf dem Markt sind und die jetzt unter REACH erneut bewertet werden müssen, liegen zwar Kurz-, aber keine Langzeitstudien an Tieren vor. Die Anwendung eines entsprechenden Faktors bei fehlen-



der Langzeitstudie ermöglicht somit eine Risikobewertung ohne weitere Tierversuche.

Welche Faktoren zur Zeitextrapolation eingesetzt werden, ist abhängig vom jeweiligen gesetzlichen Kontext. Die unterschiedlichen Regularien berufen sich auf verschiedene Annahmen und Untersuchungen. Im hier vorgestellten Projekt wurden Faktoren auf einer breiteren Datenbasis als bisher ermittelt und vor allem der Einfluss von Unterschieden im Studiendesign untersucht und verringert.

Datenbank RepDose als Basis für Faktorenberechnung

Als Datenbasis für die Berechnung der Faktoren haben Wissenschaftler am Fraunhofer ITEM die Fraunhofer-Datenbank RepDose (www.fraunhofer-repdose.de) verwendet. Zunächst berechneten sie Faktoren von Chemikalien, zu denen Studien mit unterschiedlicher Dauer vorliegen. Hierzu haben sie die Wirkschwelle einer Chemikalie aus einer Kurzzeitstudie durch die ebenfalls vorliegende Wirkschwelle aus einer Langzeitstudie geteilt. Anschließend analysierten sie die Verteilung all dieser chemikalienspezifischen Faktoren. Als allgemeinen Faktor kann man den geometrischen Mittelwert oder das 90ste Perzentil einer solchen Verteilung verwenden. Ähnliche Untersuchungen finden sich z. B. bei Kalberlah et al. (2002) oder Vermeire et al. (2001). Die Leitlinie REACH R.8 zur Ableitung von DNEL-Werten schlägt folgende allgemeine Faktoren vor: subakut zu subchronisch 3, subchronisch zu chronisch 2 und subakut zu chronisch 6 (REACH-Leitlinie 2010).

Evaluation der Zeitextrapolationsfaktoren

Die bisher publizierten Faktoren basieren auf kleinen und/oder alten und heterogenen Datensätzen. Ziel dieses Projekts war es zu evaluieren, inwieweit sich Unterschiede im Studiendesign

von Studien, die zur Ableitung der Faktoren herangezogen werden, auf die Verteilung der Faktoren und letztlich die Ableitung der allgemeinen Faktoren auswirken. Weiterhin wurde untersucht, inwieweit sich die Faktoren für verschiedene Substanzgruppen (Industriechemikalien, Pestizide, Detergenzien) unterscheiden. Die orale und inhalative Verabreichung wurden getrennt analysiert.

Ausgehend von der maximal in der RepDose-Datenbank verfügbaren Anzahl von Studienpaaren (bis zu 236 für den Vergleich subchronisch-chronisch nach oraler Verabreichung) wurde schrittweise der Einfluss verschiedener Unterschiede im Studiendesign untersucht. Den größten Einfluss auf die Faktoren hatten der Abstand zwischen den verabreichten Dosen und die generelle Vergleichbarkeit des Untersuchungsumfangs. So können beispielsweise die Wirkschwellen zweier Studien einer Chemikalie durch einen unterschiedlichen Untersuchungsumfang festgelegt sein. Wurde in der einen Studie die Wirkschwelle durch eine makroskopische Veränderung, z. B. Organ vergrößert, festgelegt, so liegt die Wirkschwelle eventuell höher, als wenn eine mikroskopische Untersuchung, z. B. auf Zellebene, durchgeführt worden wäre. Wird diese Studie aber nun mit einer Studie verglichen, deren Wirkschwelle durch eine mikroskopische Veränderung bestimmt wurde, z. B. eine zelluläre Hypertrophie, spiegelt der Faktor auch den Unterschied im Untersuchungsumfang und nicht den stoffspezifischen Zeitverlauf der Wirkschwelle wider. Dieser würde sich ergeben, wenn man in beiden Studien vergleichbare mikroskopische oder makroskopische Befunde zur Festlegung der Wirkschwelle heranzieht.

Für die abschließende Ableitung von allgemeinen Faktoren haben die Wissenschaftler nur solche berechneten Faktoren berücksichtigt, die mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließlich den zeitlichen Verlauf der Wirkschwelle wiedergeben.

Tabelle 1: Faktoren für die Zeitextrapolation.

Die Ableitung von Faktoren zur Zeitextrapolation im Rahmen dieses Projekts berücksichtigt nur Unterschiede, die auf der zeitlichen Entwicklung der Wirkschwelle und nicht auf Unterschieden im Studiendesign beruhen. Im Vergleich zu Literaturdaten, die auf heterogenen Datensätzen basieren, sind die Faktoren (ermittelt als geometrische Mittelwerte der log-normal verteilten Daten) und auch die 90sten Perzentile deutlich niedriger. Die Anwendung der niedrigeren Faktoren ermöglicht eine transparentere Risikobewertung, insbesondere bei probabilistischer Ermittlung des Gesamtextrapolationsfaktors. Hier sind beispielhaft die Verteilungen für die Faktoren subchronisch zu chronisch dargestellt.

	N	Faktor (GM)	90. Perzentil
Oral	58	1,4	3,6
Kalberlah, 2002*	68	2,7	20
Vermeire, 2001**	419	2,0	10

* Analyse von Inhalationsstudien, die aber nach bisherigen Erkenntnissen zu keinen anderen Faktoren als die oralen Studien führen.

** Metaanalyse von 11 publizierten Datensätzen (N = 9-149), sehr heterogene Daten, die z. B. Studien mit verschiedenen Spezies (von Ratte bis Hund) ohne Korrektur für Speziesunterschiede vergleichen.

Allgemeine Faktoren sind im Vergleich zu bisher publizierten Werten für die Extrapolation subchronisch zu chronisch in Tabelle 1 dargestellt.

Ausblick

Die von den Fraunhofer-Wissenschaftlern abgeleiteten Faktoren sind eine Alternative zu den bisher verwendeten Faktoren. Sie berücksichtigen erstmals lediglich die Unterschiede im Hinblick auf die zeitliche Entwicklung der Wirkschwelle, aber keine weiteren Unterschiede im Studiendesign. Weiterhin eignen sich die hier beschriebenen Verteilungen der Faktoren aufgrund ihrer geringen Streuungen für eine probabilistische Bestimmung des Gesamtextrapolationsfaktors. Die Faktoren

können helfen, die Ableitung von toxikologisch begründeten Höchstwerten auf der Basis wissenschaftlicher Fakten besser zu begründen und somit eine bessere allgemeine Akzeptanz für die festgelegten Höchstwerte zu erreichen.

Literatur

Batke, M.; Escher, S.; Hoffmann-Dörr, S.; Melber, C.; Messinger, H.; Mangelsdorf, I. (2011)
Evaluation of time extrapolation factors based on the database RepDose. Toxicol. Lett. 205: 122-129.

ECHA (2010)
REACH-Leitlinie R.8: Charakterisierung der Dosis [Konzentrations]-Wirkungs-Beziehung für die menschliche Gesundheit. Version 2: Dezember 2010, ECHA-2010-G-19-EN, 185 S.

Kalberlah, F.; Föst, U.; Schneider, K. (2002)
Time extrapolation and interspecies extrapolation for locally acting substances in case of limited toxicological data. Ann. Occup. Hyg. 46, 175-185.

Vermeire, T.; Pieters, M.; Rennen, M.; Bos, P. (2001)
Probabilistic Assessment Factors for Human Health Risk Assessment – A Practical Guide. TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, The Netherlands, TNO report V3489.



KONTAKT

Dr. Monika Batke
Telefon +49 511 5350-344
monika.batke@item.fraunhofer.de

VERGLEICH DER METHODEN ZUR ABLEITUNG VON GRENZWERTEN FÜR CHEMIKALIEN

ZUSAMMENFASSUNG

Fraunhofer-Forscher haben für das Umweltbundesamt Methoden zur Ableitung von toxikologisch begründeten Höchstwerten – also von Grenz- und Richtwerten – für Chemikalien in der Umwelt und im menschlichen Körper mit der Methode verglichen, mit der entsprechende Werte im Rahmen von REACH erhoben werden. Sie kamen zu dem Schluss, dass sich die Methoden in vielen Punkten ähneln. Für die Akzeptanz der abgeleiteten Werte für REACH ist jedoch eine größere Transparenz der angewendeten Methode erforderlich.

Grenzwerte, Beurteilungswerte oder auch Richtwerte sind ein wesentliches Element der Risikoabschätzung in der Toxikologie. Liegt eine gemessene oder berechnete Konzentration unterhalb dieser Werte, besteht im Allgemeinen keine Gefahr für die Gesundheit des Menschen. Entsprechende Werte gibt es in Deutschland bereits seit längerer Zeit für Chemikalien, die in Boden, Wasser und Luft sowie im Urin oder Blut des Menschen nachgewiesen werden können.

In einem Forschungsprojekt für das Umweltbundesamt (Licht et al., 2011) wurden die Methoden zur Ableitung solcher toxikologisch begründeter Höchstwerte mit der Methode für

die neue Chemikalienverordnung REACH verglichen (ECHA, 2010). Bei letzterer sollen Konzentrationen abgeleitet werden, unterhalb derer der Stoff die menschliche Gesundheit nicht beeinträchtigt. Diese Werte werden als Derived No Effect Level (DNEL) bezeichnet.

Der Vergleich der verschiedenen Methoden sollte Möglichkeiten für eine Vereinheitlichung ermitteln und Besonderheiten einzelner Methoden herausarbeiten.

Vergleich der Extrapolationsfaktoren

Diese Werte werden üblicherweise von der höchsten getesteten Dosis abgeleitet, die im Tierversuch keine schädliche Wirkung zeigte («...bei der die Häufigkeit oder Schwere einer schädlichen Wirkung bei der exponierten Gruppe gegenüber einer geeigneten Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant erhöht ist...»¹). Diese Dosis wird als No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) bezeichnet.

Faktoren werden verwendet, um den NOAEL auf den Menschen und dessen jeweilige Expositionssituation zu übertragen. Diese werden in den verschiedenen Methoden als Extrapolationsfaktoren, (Un-)sicherheitsfaktoren oder Assessment Factors bezeichnet.

Die Faktoren für Interspezies- und Intraspezies-Unterschiede sind in Tabelle 1 aufgeführt. Im Tierexperiment wird in vielen Fällen eine kürzere Versuchsdauer verwendet im Vergleich

¹ Quelle: <http://guidance.echa.europa.eu/public-2/glossary.htm> > NOAEL

zur oft lebenslangen (chronischen) Exposition des Menschen. Die Faktoren zur Zeitextrapolation (z. B. subakut zu chronisch: Faktor 6) werden hier nicht dargestellt. Aktuelle Forschungsergebnisse zu diesem Thema sind im Projektbericht auf Seite 70 zu finden.

Ein Faktor für Interspezies-Unterschiede berücksichtigt die Unterschiede zwischen Versuchstier und Mensch. Demgegenüber bildet der Faktor für Intraspezies-Unterschiede die unterschiedliche Empfindlichkeit in der Bevölkerung, d. h. die interindividuelle Variabilität, ab.

Für Interspezies-Unterschiede findet sich bei fast allen Methoden ein Faktor von 10. Dieser Faktor setzt sich aus der Allometrie (Ratte/Mensch: Faktor 4) und einem Faktor von 2,5 für sonstige Unterschiede zusammen. Wird für die Ableitung eine Studie mit Mäusen verwendet (Allometrie Maus/Mensch: Faktor 7), so kann sich daraus auch ein Faktor größer als 10 ergeben. Bei anderen Methoden wird diese Unterscheidung zwischen toxikokinetischem und toxikodynamischem Anteil so explizit nicht vorgenommen oder sie wird lediglich zusätzlich erläutert.

Ein Faktor von 10 für Intraspezies-Unterschiede wird auch bei vielen Methoden als Standard für die Allgemeinbevölkerung eingesetzt. Gibt es Hinweise auf eine besondere Empfindlichkeit (höher oder niedriger), kann in begründeten Einzelfällen davon abgewichen werden. Bei Richtwerten für die Innenraumluft wird standardmäßig ein zusätzlicher Faktor von 2 für die besondere Empfindlichkeit von Kindern aufgrund ihrer Physiologie verwendet. Auch bei der DNEL-Ableitung ist ein zusätzlicher Faktor für besonders empfindliche Subgruppen möglich, dessen Höhe allerdings nicht definiert ist.

Konnte kein NOAEL ermittelt werden, kann hilfsweise die niedrigste Dosis mit Effekt, der Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL) genutzt und ein Faktor zwischen 1 und 10

verwendet werden. Eine Ausnahme sind hier Richtwerte der Innenraumluft, bei denen im Regelfall von einem LOAEL ausgegangen wird.

Transparenz der Ableitungsmethoden

Für die allgemeine Akzeptanz der abgeleiteten Werte ist es wichtig, wie transparent und nachvollziehbar die Ableitung der Werte ist. In den meisten Fällen wird neben der Ableitungsmethode auch die stoffspezifische Ableitung veröffentlicht. Dies gilt z. B. für die Interpolationsmethode zur Ableitung der gefahrenbezogenen Dosis oder das Basisschema für die Ableitung der Richtwerte für die Innenraumluft. In vielen Fällen sind es auch die stoffspezifischen Ableitungen der Werte (z. B. Trinkwasser-Qualitätsziele der WHO). Sie werden teils in Zeitschriften oder Mitteilungsblättern, teils im Internet publiziert.

Nach jetzigem Kenntnisstand wird nur der DNEL-Wert auf der Internetseite der ECHA veröffentlicht, nicht aber die Ableitung mit den verwendeten Faktoren und dem gewählten NOAEL. Welche Auswirkungen dies auf die Akzeptanz der DNEL-Werte hat, kann zurzeit noch nicht abgeschätzt werden, da die DNEL-Werte erst vermehrt für Stoffe mit der Registrierungs-Dedline im Dezember 2010 abgeleitet wurden.

Fazit

In allen Fällen, in denen in Deutschland bereits Werte abgeleitet wurden, wird ein sehr ähnliches Schema verwendet. Auch die Ableitung von DNEL-Werten weicht davon nicht im Wesentlichen ab. Unterschiede finden sich jeweils nur in Details. Genauere Anleitungen, wann in welchem Umfang von den Standardfaktoren abgewichen werden kann, sind meist nicht vorhanden. Hier wird sehr oft auf Expertenwissen zurückgegriffen.



Um die Ableitung der Werte transparent zu machen, ist es notwendig, die stoffspezifische Ableitung zu veröffentlichen. Bei den DNEL-Werten unter REACH ist dies zurzeit nicht vollständig umgesetzt. Welche Auswirkungen dies auf die allgemeine Akzeptanz der neu abgeleiteten Werte hat, lässt sich nicht abschätzen.

Literatur

Licht, O.; Voss, J. U.; Mangelsdorf, I. (2011)
Verfahren der gesundheitlichen Stoffbewertung des FB II – ein Methodenvergleich von nationalen und internationalen Bewertungsgrundlagen. Forschungs- und Entwicklungsvorhaben FKZ 363 01 274, Mai 2011, für das Umweltbundesamt. Siehe auch: www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/4225.pdf

WHO, 1994

Assessing Human Health Risks of Chemicals: Derivation of guidance values for health-based exposure limits. Environmental Health Criteria Vol. 170.

ECHA, 2010

REACH-Leitlinie R.8: Charakterisierung der Dosis [Konzentrations]-Wirkungs-Beziehung für die menschliche Gesundheit. Version 2: Dezember 2010, ECHA-2010-G19-EN, 185 S.



KONTAKT

Dr. Oliver Licht
Telefon +49 511 5350-334
oliver.licht@item.fraunhofer.de

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Extrapolationsverfahren in den verschiedenen Bewertungsverfahren (*WHO drinking-water quality guideline values; **WHO air quality guideline values, Standardfaktoren nicht vorgegeben, Verweis auf WHO, 1994; # Ableitung erfolgt aus LOAEL, Faktor 3 bei einem LOAEL aus Tierversuchen. TRD = tolerierbare resorbierte Dosis; RW = Richtwert).

Verfahren	Inter-spezies	Intra-spezies	LOAEL/NOAEL	Besonderheiten
Industriechemikalien				
DNEL-Wert	4 x 2,5	10	3 (10)	zusätzliche Faktoren, abhängig von Datenumfang und -qualität
Boden				
TRD-Werte	1-10	1-10	1-10	TRD-Werte = interne Körperdosen
Trinkwasser				
Qualitätsziel WHO*	1-10	1-10	–	zusätzliche Faktoren für die »Angemessenheit der Studie« (1-10) und die »Art und Schwere des Effekts« (1-10)
Leitwerte des Umweltbundesamts	1-10	1-10	1-10	Verfahren ähnlich TRD, externe Dosis, keine Resorption
Luft				
Richtwerte Innenraumluft	10	10	– #	Kinderfaktor 2; RW I ist um Faktor 10 kleiner als RW II
Qualitätsziel WHO**	(1-10)	(1-10)	(1-10)	Betonung des »Expert Judgement«

Geschäftsfeld 4

PROJEKTÜBERSICHT

Stoffbewertungen, Chemikalien

Arbeiten im Zusammenhang mit der Europäischen Chemikalienverordnung (REACH): Beratung von Firmen, Hilfestellung bei der Vorbereitung auf die Registrierung, Evaluierung notwendiger Daten, Erstellung von IUCLID-Stoffdatensätzen und Stoffsicherheitsberichten, Entwicklung von Teststrategien, Waiving-Begründungen und Expositionsszenarien

Bearbeitung und Aktualisierung von IUCLID-Stoffdatensätzen, »SIDS Initial Assessment Profiles« und »SIAR Hazard Assessments« für Industriechemikalien im Rahmen der HPV-Initiative des Weltchemieverbandes (ICCA); besondere Erfahrungen zu Stoffgruppenbetrachtungen (»category approaches«)

Erstellung von »International Chemical Safety Cards« (ICSC) im Rahmen des »International Programme on Chemical Safety« (IPCS) für die Weltgesundheitsorganisation (WHO)

Erstellung von Stoffberichten für das Noxen-Informationssystem NIS im Auftrag von verschiedenen Landesministerien

Neustoffanmeldungen und Beratungsverträge im Auftrag japanischer Firmen

Erstellung von Gutachten zur Toxikologie verschiedener Chemikalien

Toxikologische Gutachten und Risikobewertung für Verunreinigungen oder Rückstände in Medizinprodukten

Biozide

Erstellung von Dossiers für die Bewertung von »alten« bioziden Wirkstoffen im Rahmen der 4. Prioritätenliste der EU-Altbiozid-Review-Regulation, inkl. Erarbeitung von Expositionsszenarien und Prüfstrategien

Bearbeitung von Nachforderungen bzw. Austausch mit Zulassungsbehörden, um die bioziden Wirkstoffe in Annex I/II nach Richtlinie 98/8/EG aufzunehmen

Entwicklung von Konzepten für die Produktzulassung, inkl. Studienmonitoring, Risikobewertungen, Erarbeitung von Expositionsszenarien und Prüfstrategien

QSAR, Datenbanken

Datenerfassung und -analyse zur Kategorienbildung bei Kohlenwasserstoffgemischen

Verfeinerung der TTC-Inhalationsgrenzwerte im Auftrag von Cefic

Analyse organspezifischer Toxizität in vivo und Korrelation zu In-vitro-Testsystemen im Auftrag von Cefic

Stoffbewertung aufgrund von (Q)SAR und »Read Across«

Analyse von Extrapolationsfaktoren für Zeit, Interspezies und Routen und Kombination der Verteilungen im Auftrag von ERASM

Bericht zu Struktur-Wirkungsbeziehungen von Glykolether im Auftrag des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Bewertung Human- und Tierarzneimittel

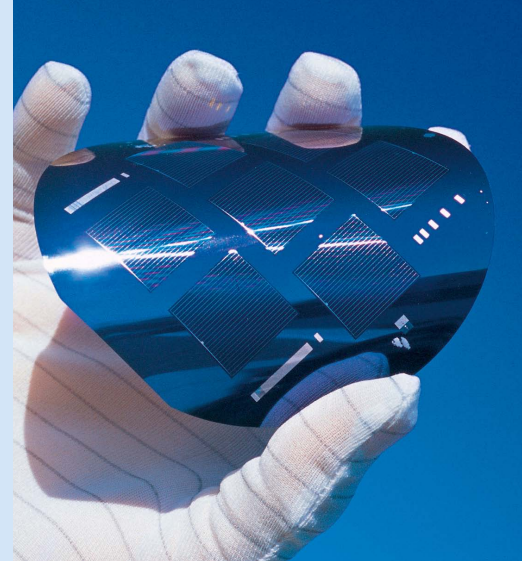
Bewertung der Auswirkungen von Arzneimitteln auf die Umwelt

Erstellung von Gutachten für die Zulassung von Tierarzneimitteln

Expositionsabschätzungen

Erstellung von »Environmental Health Criteria Documents« (EHC) zu »Dermal exposure« im Rahmen des »International Programme on Chemical Safety« (IPCS) für die Weltgesundheitsorganisation (WHO)

FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT



Forschen für die Praxis ist die zentrale Aufgabe der Fraunhofer-Gesellschaft. Die 1949 gegründete Forschungsorganisation betreibt anwendungsorientierte Forschung zum Nutzen der Wirtschaft und zum Vorteil der Gesellschaft. Vertragspartner und Auftraggeber sind Industrie- und Dienstleistungsunternehmen sowie die öffentliche Hand.

Die Fraunhofer-Gesellschaft betreibt in Deutschland derzeit mehr als 80 Forschungseinrichtungen, davon 60 Institute. Mehr als 18 000 Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter, überwiegend mit natur- oder ingenieurwissenschaftlicher Ausbildung, bearbeiten das jährliche Forschungsvolumen von 1,65 Milliarden Euro. Davon fallen 1,40 Milliarden Euro auf den Leistungsbereich Vertragsforschung. Über 70 Prozent dieses Leistungsbereichs erwirtschaftet die Fraunhofer-Gesellschaft mit Aufträgen aus der Industrie und mit öffentlich finanzierten Forschungsprojekten. Knapp 30 Prozent werden von Bund und Ländern als Grundfinanzierung beigesteuert, damit die Institute Problemlösungen erarbeiten können, die erst in fünf oder zehn Jahren für Wirtschaft und Gesellschaft aktuell werden.

Internationale Niederlassungen sorgen für Kontakt zu den wichtigsten gegenwärtigen und zukünftigen Wissenschafts- und Wirtschaftsräumen.

Mit ihrer klaren Ausrichtung auf die angewandte Forschung und ihrer Fokussierung auf zukunftsrelevante Schlüsseltechnologien spielt die Fraunhofer-Gesellschaft eine zentrale Rolle im Innovationsprozess Deutschlands und Europas. Die Wirkung der angewandten Forschung geht über den direkten Nutzen für die Kunden hinaus: Mit ihrer Forschungs- und Entwicklungsarbeit tragen die Fraunhofer-Institute zur Wettbewerbsfähigkeit der Region, Deutschlands und Europas bei. Sie fördern Innovationen, stärken die technologische Leistungsfähigkeit, verbessern die Akzeptanz moderner Technik und sorgen für Aus- und Weiterbildung des dringend benötigten wissenschaftlich-technischen Nachwuchses.

Ihren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern bietet die Fraunhofer-Gesellschaft die Möglichkeit zur fachlichen und persönlichen Entwicklung für anspruchsvolle Positionen in ihren Instituten, an Hochschulen, in Wirtschaft und Gesellschaft. Studierenden eröffnen sich an Fraunhofer-Instituten wegen der praxisnahen Ausbildung und Erfahrung hervorragende Einstiegs- und Entwicklungschancen in Unternehmen.

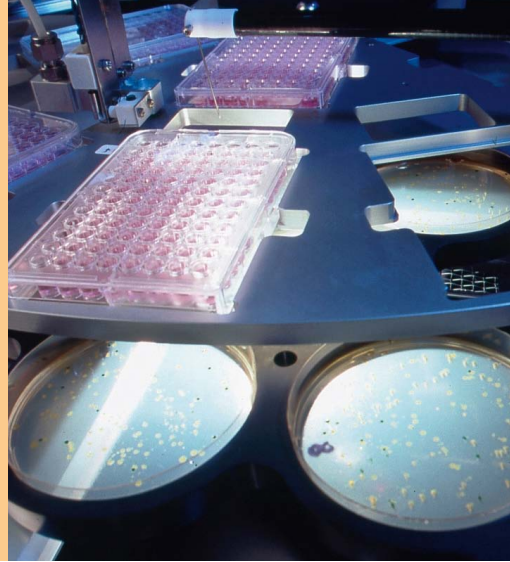
Namensgeber der als gemeinnützig anerkannten Fraunhofer-Gesellschaft ist der Münchner Gelehrte Joseph von Fraunhofer (1787–1826). Er war als Forscher, Erfinder und Unternehmer gleichermaßen erfolgreich.

KONTAKT

Fraunhofer-Gesellschaft
Presse- und Öffentlichkeitsarbeit
Franz Miller
Telefon +49 89 1205-1333
Fax +49 89 1205-7515

Hansastraße 27c
80686 München

FRAUNHOFER-VERBUND LIFE SCIENCES



FORSCHUNG FÜR DIE GESUNDHEIT UND DIE UMWELT DES MENSCHEN

Sechs Fraunhofer-Institute stellen die Lebenswissenschaften in den Fokus ihrer Forschung. Im Fraunhofer-Verbund Life Sciences bündeln sie ihre Kompetenzen in Biologie, Biomedizin, Pharmakologie, Toxikologie und Lebensmitteltechnologie. Mit rund 1200 Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern stellt der Fraunhofer-Verbund Life Sciences einen wichtigen FuE-Partner für die Pharma- und Biotechnologiebranche ebenso wie für die Chemieindustrie und Medizintechnikunternehmen dar.

Die Fraunhofer-Institute für Biomedizinische Technik IBMT, Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik IGB, Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME, Toxikologie und Experimentelle Medizin ITEM, Zelltherapie und Immunologie IZI sowie Verfahrenstechnik und Verpackung IVV führen ihr konzentriertes Know-how zusammen, um für ihre Kunden auch übergreifende Projekte erfolgreich durchführen zu können. Die Forschung und Entwicklung im Fraunhofer-Verbund Life Sciences umfasst sowohl die präventiven Bereiche Umweltschutz und Verbraucherschutz als auch die regenerativen Bereiche medizinische Therapie und Umweltsanierung. Die Bandbreite an Methoden und Ausstattung, die der Fraunhofer-Verbund Life Sciences vereint, sucht in dieser Konzentration ihresgleichen.

Die Forschung im Fraunhofer-Verbund Life Sciences ist durch ihre Anwendungsnähe zur Industrie gekennzeichnet, um bedarfsorientierte Lösungen für seine Kunden zu entwickeln. Zudem forschen die Institute auch an den Grundlagen, um so die Basis für zukünftige Anwendungen in der Industrie zu

schaffen. Die Geschäftsfelder des Fraunhofer-Verbunds Life Sciences umfassen die medizinische Translationsforschung und Biomedizintechnik, die regenerative Medizin, gesunde Lebensmittel, Biotechnologie für die industrielle Nutzung sowie die Forschung für Sicherheit bei Prozessen, Chemikalien und Pflanzenschutzmitteln.

Es werden Wege aufgezeigt, Gesundheit und Umwelt in einer industrialisierten Welt zu erhalten und Möglichkeiten entwickelt, Krankheiten im Rahmen einer stärker personalisierten Medizin zu diagnostizieren und zu therapieren sowie die Umwelt zu sanieren.



KONTAKT

Fraunhofer-Verbund Life Sciences
Prof. Dr. Dr. Uwe Heinrich
(Vorsitzender)



Geschäftsstelle im Fraunhofer ITEM
Dr. Claus-Dieter Kroggel
(Leiter der Geschäftsstelle)
Telefon +49 511 5350-103
Fax +49 511 5350-155
claus.kroggel@vls.fraunhofer.de

WWW.LIFESCIENCES.FRAUNHOFER.DE

FRAUNHOFER INSTITUTE FOR TOXICOLOGY AND EXPERIMENTAL MEDICINE ITEM

PERFORMANCE AND RESULTS

ANNUAL REPORT

2011

CONTENTS

Foreword	86
-----------------	----

Profile of the Institute	88
Focuses of our work	88
Future areas of work	91
Advisory Board	92
Staff and institute budget performance	93
Fraunhofer ITEM organizational chart	94
News in 2011	96

BUSINESS UNIT 1

Drug Research, Drug Development and Medical Biotechnology	98
--	----

Project Reports

Manufacture of biopharmaceuticals using alternative, time-saving methods	102
Epigenetic mechanisms in lung cancer cells	105
COPD: cell culture model for drug testing	108
Fraunhofer project "Aeskulap": development of a fast and reliable diagnostic method for sepsis	111

Project Overview	113
-------------------------	-----

BUSINESS UNIT 2

Clinical Airway Research	114
---------------------------------	-----

Project Reports

Universal allergen challenge method validated in the Fraunhofer ECC	118
Reproducible inflammatory response after segmental endotoxin challenge in healthy volunteers	120
RIBOLUTION: novel biomarkers for diagnosis and therapy	124

Preliminary Research

Non-invasive quantification of airway inflammation by magnetic resonance imaging	126
Low-dose endotoxin inhalation challenge – a model for early-phase clinical drug development	128
Pilot study: effects of grass pollen on the skin condition of patients with atopic dermatitis	130

Project Overview	131
-------------------------	-----

BUSINESS UNIT 3

Occupational and Environmental Toxicology and Consumer Protection 132

Project Reports

Analytical methods for risk assessment of 3-MCPD
esters and glycidyl esters 136

Development and trial of simple tests to assess the
exposure potential and lung toxicity of consumer sprays 139

Effects of inhaled fine and nano-sized titanium dioxide
in the rat lung 142

Project Overview 145

BUSINESS UNIT 4

Testing and Registration of Chemicals, Biocides and Pesticides 148

Project Reports

Time extrapolation factors in repeated-dose studies 152

Comparison of methods used to derive
limit values for chemicals 155

Project Overview 158

Fraunhofer-Gesellschaft 160

Fraunhofer Group for Life Sciences 162

Names, Dates, Events 164

Publications 164

Doctorates 167

Bachelor's theses 169

Invited lectures at conferences 170

Contributions to conferences 172

Active participation in committees 174

Research projects 178

Cooperation with institutions and universities 180

Visiting scientists 182

Prizes for scientific work 182

Exhibitions, congresses, and workshops 183

FOREWORD

Dear Reader,

The year 2011 was a special year for the Fraunhofer ITEM: it allowed us to look back on 30 years of successful health research, both in the fields of preventive medicine and therapy. The anniversary ceremony though at the same time made us look to the future, because on the occasion of the festivities we also turned the first sod for the Clinical Research Center Hannover – the CRC Hannover. With this new study center, planned to become operational in fall 2013, clinical airway research at the Fraunhofer ITEM will receive the desperately needed expansion. In addition, this center also represents an example of two non-university research institutions – the Fraunhofer ITEM and the Helmholtz Center for Infection Research – and a university – the Hannover Medical School – collaborating in a research building for early-phase clinical studies. For all three organizations, medical translational research, that is, the development of novel therapies and diagnostics from bench to bedside, is a matter of great importance.

There were actually several “foundations stones” laid during the past year, not only at our main premises in Hannover. In Regensburg’s Biopark in southern Germany, the renowned researcher Professor Christoph Klein set up a Fraunhofer project group in the field of personalized cancer therapy in connection with his chair at the University of Regensburg. With this project group, the area of drug research and development at the Fraunhofer ITEM has been enhanced to include a new thematic focus. A substantial expansion was also completed at the Braunschweig location. The Braunschweig-based staff of the Division of Pharmaceutical Biotechnology moved into new and newly equipped facilities on the campus of the Helmholtz Center for Infection Research. All in all, they now have at their disposal about 2000 m² of laboratories and pilot plants for process development, scale-up, GMP manufacture, and fill and finish. Our biotechnology experts, who have been successfully engaged in the biopharmaceuticals market for over ten years, are thus now in a position to considerably expand the scope of research and services they offer.

Another setup that took place in 2011 was that of the German Center for Lung Research – a Germany-wide alliance of six excellent universities and non-university cooperation partners –, receiving long-term funding from the German Federal Ministry of Education and Research and aimed at the rapid development

of diagnostic methods and novel therapies for respiratory diseases. In this research alliance, the Fraunhofer ITEM is participating together with the Hannover Medical School. With the CRC Hannover, the institute is also involved in another center for health research, the German Center for Infection Research.

The Fraunhofer ITEM can thus look to the future with confidence. Many foundation stones have been laid, numerous projects have been started. An overview of the focuses of our work and some examples of current research projects are given in this Annual Report 2011.

For all this, I would like to thank the institute's staff, the members of its Advisory Board, its promoters and clients. Without their commitment, this progress would not have been possible. I look forward to continued fruitful cooperation in the future.



A handwritten signature in black ink, which appears to read 'U. Heinrich'.

Prof. Dr. Dr. Uwe Heinrich
Executive Director

PROFILE OF THE INSTITUTE

FOCUSES OF OUR WORK

Protecting man from health hazards in our industrialized world and contributing to the development of novel therapeutic approaches – these are the aims of the Fraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicine ITEM. A focus is on airway research: a wide range of airborne substances – pollutants but also pharmaceuticals – are taken up via the lungs. In collaboration with our clients from industry, industry associations, occupational safety and health organizations, and public authorities we develop and test novel medications against respiratory diseases – in particular asthma, allergic rhinitis, and chronic bronchitis (COPD) –, study mechanisms of action, and determine the risks of potentially harmful substances. Due to our wide spectrum of expertise we are able to offer complete solutions – from the idea to the product.

Our focus: lungs and airways

The respiratory tract is the focus of research at the Fraunhofer ITEM. In in-vitro and in-vivo models, primarily substances that are taken up via the airways are studied. These include single components, such as fibrous dusts or ultrafine particles and nanoparticles, but also complex mixtures that are encountered at the workplace or in the environment, as for instance exhaust gases from automobiles and coking plants, or bitumen fumes.

Testing and development of pharmaceuticals

With regard to inflammatory and allergic diseases of the respiratory tract the Fraunhofer ITEM offers research and development services from the molecular level to clinical trials. Methods of cell biology and molecular biology are used to validate novel target structures for diagnosis and therapy and optimize

these during early development stages. Once possible drug candidates have been identified, efficacy and safety tests are performed. For drug registration in compliance with GLP (Good Laboratory Practice) regulations the Fraunhofer ITEM performs toxicological and safety pharmacological testing. The institute's Division of Pharmaceutical Biotechnology develops manufacturing processes for biopharmaceutical active ingredients. For clinical trials with biopharmaceuticals we manufacture the investigational medicinal product in compliance with GMP (Good Manufacturing Practice) guidelines. A GMP unit for the aseptic filling of infusion solutions is also available.

Clinical studies

For the registration of pharmaceuticals for the indications allergy, asthma, and COPD, the Fraunhofer ITEM conducts clinical studies, mainly of phases I-II, in compliance with GCP (Good Clinical Practice) guidelines, managed by highly qualified physicians. The special equipment the institute disposes of for these studies includes different environmental exposure units. In the "Fraunhofer Environmental Challenge Chamber", which so far has been used to expose test subjects to grass pollen and house dust mite allergens, tests with other allergens are also planned for the future.

Personalized tumor therapy

Personalized tumor therapy is the research topic of the Fraunhofer project group with exactly this name that took up work at the University of Regensburg in 2011. Its focus is on application-oriented basic research into the formation of metastases and the translation of the results obtained into novel diagnostic methods and therapeutic products.



Overview of topics

DIAGNOSIS AND THERAPY

Testing and development of medications and diagnostics

- Pharmacological and toxicological research and GXP studies
- Clinical research and development in the area of inflammatory and allergic airway diseases

PREVENTION

Analysis and assessment of potentially harmful substances

- Toxicological investigations, hazard and risk assessments; in particular for inhalable toxic substances
- Testing and registration of chemicals, biocides, and plant protection products

MECHANISTIC INVESTIGATIONS

- Pathogenesis of diseases
- Exogenous and endogenous active substances

Assessment of potentially harmful substances

Be it at workplaces, in the environment, or in consumer products – we detect toxic substances and evaluate the human exposure situation. Complex atmospheres can be reproduced on a laboratory scale. The Fraunhofer ITEM offers all types of investigations: from the analysis of airborne pollutants to the generation of appropriate test aerosols for in-vivo and in-vitro studies. To enable reliable risk assessment, inhalation studies and general toxicological studies are performed in cells, tissues, and organisms.

Risk assessment and registration of chemicals

Based on their own experimental results, literature searches, and data provided by clients, our scientists prepare reports on test substances and, if required, perform human exposure and risk assessments. In addition, the institute supports its clients in the registration of chemicals and complex mixtures and in the assessment of substances falling under the new European chemicals regulation REACH.

Top-level quality

The responsibility of the Quality Assurance Unit (QAU) is to ensure that the studies conducted at the institute are performed at a consistently high level in compliance with GXP guidelines. As one of the institute's central service units, it supervises compliance with the legally required quality assurance systems GLP, GMP, and GCP, which ensure that the procedures of drug development and manufacturing and of chemical safety testing are performed reliably and reproducibly and that the generated data are valid.

Expertise in measurement technology and process engineering: inhalable aerosols for health research

For inhalation studies, the comprehensive expertise and many years of experience of the aerosol technologists at the Fraunhofer ITEM are an essential prerequisite. Their know-how on the aerosolization of substances and on the deposition and kinetics of inhaled substances is also used to develop pharmaceutical aerosols.

Pooling together expertise

The Fraunhofer ITEM cooperates with partner institutes within the Fraunhofer-Gesellschaft and also pools together its own expertise with that of external cooperating partners. This puts the institute in a position to offer an even broader range of research services. Important partners nearby the institute are, for example, the Hannover Medical School (MHH), the Braunschweig-based Helmholtz Center for Infection Research (HZI), and TWINCORE.

It is in cooperation with the MHH and the HZI that the Fraunhofer ITEM is setting up a new translational research center, the "Clinical Research Center Hannover" (CRC Hannover). The first sod was turned in May 2011. Already in fall 2013, safety and efficacy testing of new medications that have not yet been approved by the authorities for commercial use is to be performed there. The CRC Hannover will offer an optimal infrastructure for early-phase clinical trials (phases I and II) and will provide the basis for a stronger dovetailing of basic research and clinical research. The new study center is an important constituent of the medical translational alliance in Lower Saxony (TRAIN). TRAIN is a cross-disciplinary alliance of university and non-university institutions in Lower Saxony, funded by the Lower Saxony Ministry of Science and Culture and aimed at developing novel medications and vaccines and transferring these from bench to bedside at reduced cost and time wherever possible.

The institute has pooled its competences to form four business units:

1. Drug Research, Drug Development and Medical Biotechnology
2. Clinical Airway Research
3. Occupational and Environmental Toxicology and Consumer Protection
4. Testing and Registration of Chemicals, Biocides and Pesticides



FUTURE AREAS OF WORK

Recognizing technological trends and current market developments and adjusting accordingly the scope of services offered are among the hallmarks of the Fraunhofer ITEM's successful concept. Preliminary research projects and the resulting scientific findings and innovative technologies are just as beneficial to the institute's clients as in-depth studies and downstream projects. This is why the following work areas and competences have been established or further expanded:

Toxicology

- Development of an aerosol generator for carbon nanotubes (CNT) for use in inhalation experiments
- Development of a procedure for automated specific detection and quantification of biogenic air pollutants
- Development of validated in-vitro screening tests to investigate the potential hazards of nanoparticles
- Development of methods for targeted investigation of pathological changes and of nanoparticles from histological slices by electron microscopy
- Immunological and histopathological examination of human sample material from the respiratory tract
- Development of intelligent testing strategies in chemical risk assessment
- Development of adequate toxicological and pharmacological test systems for use in the registration of biopharmaceuticals in compliance with EMA (European Medicines Agency) requirements
- Setup of toxicological databases
- Investigation of structure-activity relationships in toxicology (QSAR)
- Development of risk assessment strategies for chemical categories to support registration of chemicals under the new European chemicals regulation REACH

Pharmacology

- In-vitro testing (screening) of airborne aerosols, including drug candidates
- Further development of ex-vivo techniques (precision-cut lung slices, PCLS) for investigating the effects of substances on the lungs of different animal species and on human lungs (for example, to determine the allergenic potential of chemicals and pharmaceuticals)
- Development of pulmonary inflammation models in non-human primates (in collaboration with the German Primate Center in Göttingen, Germany)
- Further development of animal models of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma, and lung infections for drug development
- Generation of exposure atmospheres with different allergens for clinical trials of specific immunotherapy in the Fraunhofer Environmental Challenge Chamber
- Identification of novel biomarkers in exhaled breath for diagnosis and treatment monitoring of respiratory diseases
- Development of novel biomarkers (ncRNA) for chronic obstructive airway diseases
- Imaging techniques (MRI, CT, and PET) for use in clinical research on effects
- Aerosols in medical device technology: development and qualification of innovative inhalation technologies
- Use of nanoparticles for therapeutic purposes, for example as delivery vehicles of therapeutic antibodies
- Development and validation of robust platform technologies for producing biopharmaceutical active ingredients based on recombinant antibodies and nucleic acids

ADVISORY BOARD

The advisory boards of the individual Fraunhofer institutes act as purely advisory bodies to their institute's management. The members come from academia, industry, and government agencies. In 2011, the Board of the Fraunhofer ITEM was made up of the following members:

Dr. Eckhard von Keutz

Chairman of the Advisory Board
Senior Vice President, Global Head Early Development,
Bayer HealthCare AG

Professor Dr. Dieter Bitter-Suermann

Deputy Chairman of the Advisory Board
President and member of the Presidential Council responsible
for the Division of Research and Teaching of the Hannover
Medical School

Professor Dr. Helmut Blome

Director, Institute for Occupational Safety and Health of the
German Institutions for Statutory Accident Insurance and
Prevention

Dr. Ulrich Deschl

Head of Nonclinical Drug Safety,
Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG

Professor Dr. Paul-Georg Germann

Senior Vice President, Nycomed GmbH

Professor Dr. Thomas Jung

Translational Medicine Head European Union, Novartis Pharma AG

Dr. Günther Karmann

Managing Director, Karmann Consulting GmbH

Dr. Martin Kayser

Senior Vice President, Head of the Department of
Product Safety, Regulations, Toxicology and Ecology, BASF AG

Professor Dr. Hillel S. Koren

Managing Director, Environmental Health, LLC,
former Director Human Studies Division,
United States Environmental Protection Agency,
Research Professor Carolina Environmental Program,
The University of Carolina at Chapel Hill, USA

Professor Dr. Reinhard Pabst

Lower Saxony Senior Research Professor of Immunomorphology,
Hannover Medical School

Professor Dr. Klaus F. Rabe

Head of Pneumology, Medical Director and Medical Executive
Director, Grosshansdorf Hospital;
Internal Medicine – Pulmonology, Christian Albrechts University
of Kiel

Professor Dr. Gerhard Schlüter

Consultant in Toxicology,
former Global Head Toxicology, Bayer HealthCare AG

Ministerialrat Dr. Hans Schroeder

Head of Division for Science and Economy, EU Structural Funds,
Lower Saxony Ministry for Science and Culture

Dr. Thor A. Voigt

Head of Global Clinical Operations, Biometrics &
Data Management,
Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG

STAFF AND INSTITUTE BUDGET PERFORMANCE

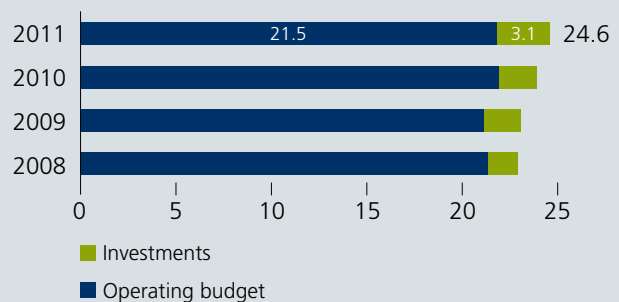
At the end of 2011, 263 people were employed at the Fraunhofer ITEM. The following list gives the numbers of employees by occupational groups:

- 91 scientists
- 69 graduates
- 79 technical staff
- 4 Ph. D. students
- 3 laboratory assistants
- 5 other assistants
- 12 apprentices

In 2011, the institute budget reached a level of 21.5 million euros*. Financing by acquired funding amounted to 72 percent. The share of industrial income in the institute's budget was approximately 34 percent – with regard to the Hannover facility it was approximately 42 percent. Investments of the Fraunhofer ITEM amounted to approximately 3.1 million euros.

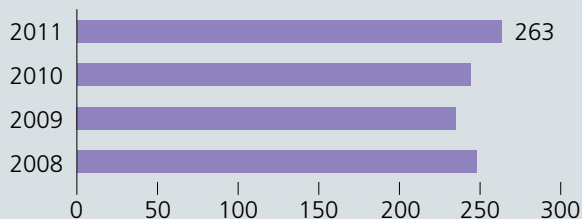
Total budget of the Fraunhofer ITEM

In million euros



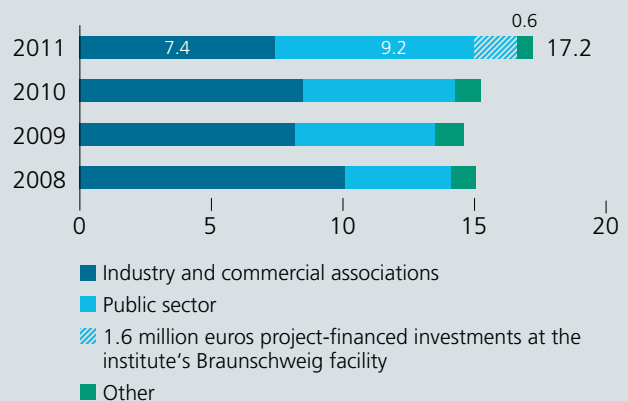
Staff of the Fraunhofer ITEM

No. of employees



Sponsors and external income of the Fraunhofer ITEM

In million euros



* preliminary figures, valid at the time of printing

FRAUNHOFER ITEM ORGANIZATIONAL CHART

Quality Assurance: Dr. I. Fleischhauer

Administration: S. Reichert

Information Technology: Dr. G. Spiekermann

Facility Management: L. Illichmann

Library: C. Jürgens

Marketing/PR: Dr. F. Drenk, Dr. C. Nastevska, K. Neubert

INSTITUTE DIRECTORS

Prof. Dr. Dr. U. Heinrich (Executive Director)

Prof. Dr. N. Krug

EXECUTIVE COMMITTEE

Institute Directors and Division Directors

Toxicology and Environmental Hygiene

Prof. Dr. C. Dasenbrock

Inhalation Toxicology

Dr. O. Creutzenberg

Dr. B. Bellmann

Regulatory and General Toxicology

Dr. R. Fuhst

Reproductive Toxicology

Dr. J. Buschmann

Clinical Chemistry and ADME

Dr. T. Hansen

Pathology

Priv.-Doz. Dr. S. Rittinghausen

Genetic and In Vitro Toxicology

Dr. C. Ziemann, Dr. J. Knebel

Mechanistic Toxicology

Dr. R. Halter

Dr. M. Niehof

Animal Laboratory

Dr. T. Tillmann

Airway Research

Prof. Dr. J. Hohlfeld

Clinical Airway Research

Prof. Dr. J. Hohlfeld

Dr. P. Badorrek

Development of Clinical Methods

Dr. O. Holz

Clinical Pharmacology

Prof. Dr. J. Frölich

Airway Immunology

Prof. Dr. A. Braun

Biomarkers and Infection

Dr. M. Müller

Airway Pharmacology

Dr. H.-G. Hoymann

Immunopharmacology and Immunotoxicology

Dr. K. Sewald

Pharmaceutical Biotechnology

Dr. H. Ziehr

Quality Control

Dr. L. Baydoun

Dr. I. Oltmann-Norden

Cell Culturing Techniques

Dr. V. Hecht

Dr. S. Duvar

Microbial Culturing

Dr. A. Ross

Dr. K. Bohle

Downstream Processing

Dr. J. Paulsen

Dr. C. Lürer

Aseptic Fill and Finish

Dr. H. Ziehr

G. Böckenholt



This organizational chart gives you the contact persons for the institute's divisions, departments, and competences at a glance. The Division of Pharmaceutical Biotechnology is based in Braunschweig, but is also responsible for the Fraunhofer ITEM's GMP fill-and-finish plant in Hannover. The Fraunhofer Project Group is based in the BioPark Regensburg and was set up as a joint initiative of the Fraunhofer ITEM, the Fraunhofer-Gesellschaft, and the University of Regensburg. The institute is currently operating in four business units, which will be presented together with selected projects in the second part of this Annual Report.

NEWS IN 2011

Groundbreaking for the new center for early-phase clinical trials

On May 5, 2011, the first sod was turned for the new Clinical Research Center Hannover (CRC Hannover), which is being set up on the grounds of the Fraunhofer ITEM. According to Professor Uwe Heinrich, Executive Director of the Fraunhofer ITEM, this new center for early-phase clinical studies will make it possible to translate research results quickly into novel medications and diagnostic methods. The CRC Hannover is being established as a joint venture with two strong partners: the nearby Hannover Medical School and the Helmholtz Center for Infection Research. As of fall 2013, new medications that have not yet been approved by the authorities for commercial use are planned to be tested for safety (phase-I trials) and efficacy (phase-IIa trials) in the new study center. Sixty beds will be available for this, as well as the necessary infrastructure for research and clinical trials.



German Center for Lung Research has come on stream

The Fraunhofer ITEM is participating in the German Center for Lung Research (DZL). This new Germany-wide alliance of six excellent universities and non-university research institutions took up its activities in 2011. In addition to Hannover, institutions at four other locations in Germany are participating. Their aim is to expedite the development of effective therapies, in particular for treating chronic diseases of the lung. The Fraunhofer ITEM will be involved above all in the research on asthma and allergies and on chronic bronchitis (COPD). In these fields, the institute is bringing in many years of experience in research and clinical trials.



DZL
Deutsches Zentrum
für Lungenforschung

In-vitro test system patented

A new technology allows the response of lung cells to airborne substances – pollutants as well as pharmaceuticals – to be observed in real time. The culturing and exposure system P.R.I.T.[®] ALI, which was developed at the Fraunhofer ITEM, was patented in 2011. Using this new system, scientists can culture different cells from the



respiratory tract or tissue cultures on specifically designed multi-well plates with standardized dimensions, subsequently expose them to test atmospheres at the air/liquid interface, and

analyze the biological effects of the treatment – already during the exposure. Such on-line monitoring opens up new possibilities of recognizing biological effects of substances.

Fraunhofer Medal awarded

On March 31, 2011, about 200 guests from academia, government, and industry celebrated the 10th anniversary and excellent progress of the Fraunhofer Group for Life Sciences. The Executive Board of the Fraunhofer-Gesellschaft awarded the Fraunhofer Medal to Professor Uwe Heinrich for his founding, developing, and 10 years of successfully chairing this group which has led the life sciences under the Fraunhofer umbrella brand to national and international prominence. Professor Ulrich Buller, Senior Vice President for Research Planning, presented the medal to Uwe Heinrich with words of praise: "Professor Heinrich's representation of the group has been to the Executive Board's perfect satisfaction." The Group for Life Sciences was the latest and smallest Fraunhofer group to be established, but in the meantime has reached a staff of 1200 employees from six Fraunhofer institutes.



"Nobel prize in cancer research"

In 2011, the renowned Dr. Josef Steiner Prize, also referred to as "Nobel prize in cancer research", was awarded to Professor Christoph Klein. He received the prize for his basic research into the spreading of cancer cells and the formation of metastases. Since mid-2011, Professor Klein has been setting up the newly founded Fraunhofer Project Group in Regensburg, which is assigned to the Fraunhofer ITEM in Hannover.



Charity book sale

In 2011, like every year, the institute's library was rather crowded just before Christmas. This was due to the well-established charity book sale, for which the institute's staff donate books they no longer want to keep and – in exchange for a small donation – can take home other books contributed by their colleagues. The total proceeds of this book sale, amounting to 485 euros this year, were donated to the street magazine "Asphalt", which supports homeless people in the area.

Braunschweig: Pharmaceutical Biotechnology in new facilities

The staff of the Fraunhofer ITEM Division of Pharmaceutical Biotechnology are happy with their new facilities on the Braunschweig campus of the Helmholtz Center for Infection Research. The approximately 50 employees, who in the past were dispersed across four different buildings, now finally benefit from short distances. Besides a 700-square-meter floor providing office and meeting space, they now have at their disposal two and a half floors with a total of about 2000 square meters of laboratories and pilot plants for process development and scale-up plus 600 square meters with clean rooms of classes D and C for GMP manufacture of biopharmaceutical active ingredients by means of microorganisms and animal cells. In addition, the existing clean-



room area has been enlarged by a class-B clean room, where investigational medicinal products can now be manufactured and filled into vials and ampoules under sterile conditions.



DRUG RESEARCH, DRUG DEVELOPMENT AND MEDICAL BIOTECHNOLOGY

Project Reports

**Manufacture of biopharmaceuticals using
alternative, time-saving methods**

Epigenetic mechanisms in lung cancer cells

COPD: cell culture model for drug testing

**Fraunhofer project "Aeskulap": development of a
fast and reliable diagnostic method for sepsis**

Project Overview



With the competences pooled in this business unit, we support our clients in all phases of the drug development process: from lead discovery and optimization via pre-clinical selection and testing of candidate drugs to clinical trials (see business unit Clinical Airway Research, page 116). Furthermore, this business unit includes the biotechnological manufacture of biopharmaceuticals.

A broad range of in-vitro test methods can be used both as screening systems in early phases of drug development and for target validation and efficacy testing. The selection of cellular test systems for individual studies is based on a variety of criteria, including relevance of the species, the organ, and the active ingredient, selection of the endpoints to be analyzed, and other requirements. In the context of pre-clinical candidate selection, standard genotoxicity tests and in-vitro ADME studies (e.g. CYP profiling, CYP inhibition, and CYP induction) are performed according to international regulatory guidelines (OECD, EMA, FDA). A broad spectrum of molecular biological and biochemical methods is available to detect unwanted side effects of pharmacological agents already at an early stage of drug development and to find mechanistic explanations for these.

Safety testing of biopharmaceuticals, such as human recombinant antibodies, requires special test systems to allow for unwanted immunological effects to be detected and ruled out with the greatest certainty possible prior to first trials in man. To this end, experimental approaches which reflect possible immunological responses of the human organism as accurately as possible are developed at the Fraunhofer ITEM. The use of viable lung slices, for example, enables species comparisons via monkeys even up to humans.



For pharmaceutical testing and other research issues in-vivo studies continue to be mandatory and required by legislation. The Fraunhofer ITEM offers the following investigations:

- Toxicity studies in rodents and non-rodents
- Toxicity studies in juvenile animals (juvenile toxicology)
- Toxic- and pharmacokinetics studies
- Investigations to detect subchronic and chronic toxic effects
- Identification of carcinogenic, teratogenic, or mutagenic effects
- Safety-pharmacological studies
- Use of imaging techniques, such as micro-computed tomography and optical imaging, to demonstrate target binding and the treatment success of novel pharmaceuticals
- Transgenic mouse models (adenocarcinomata of the lung and liver) and murine infection models for target validation and efficacy studies
- Investigations in asthma, allergy, inflammation, and infection models
- Studies on the measurement of lung function parameters in rodents (invasive and non-invasive)

Both in-vitro and in-vivo studies are conducted in compliance with the applicable GLP guidelines. In addition to experimental studies, the Fraunhofer ITEM offers its clients assistance in meeting the requirements of the pharmaceutical registration process, including the necessary documentation.

In the area of biotechnology, the Fraunhofer ITEM develops and validates manufacturing processes for active biopharmaceutical ingredients. These can be manufactured for pre-clinical and clinical trials according to GMP quality standards, whenever required. The range of active ingredients that can be produced includes proteins, glycoproteins, antibodies, nucleic acids, virus-like particles, and bacteriophages. There is already a great demand for GMP-grade therapeutic antibodies, and a similar situation is foreseeable for nucleic acids. Robust platform technologies that enable GMP manufacture of these compounds are being developed at the Fraunhofer ITEM.

CONTACTS



Dr. med. vet. Rainer Fuhst
Phone +49 511 5350-454
rainer.fuhst@item.fraunhofer.de



Dr. Monika Niehof
Phone +49 511 5350-570
monika.niehof@item.fraunhofer.de



Dr. Holger Ziehr
Phone +49 531 6181-6000
holger.ziehr@item.fraunhofer.de

Project Report

MANUFACTURE OF BIOPHARMACEUTICALS USING ALTERNATIVE, TIME-SAVING METHODS

SUMMARY

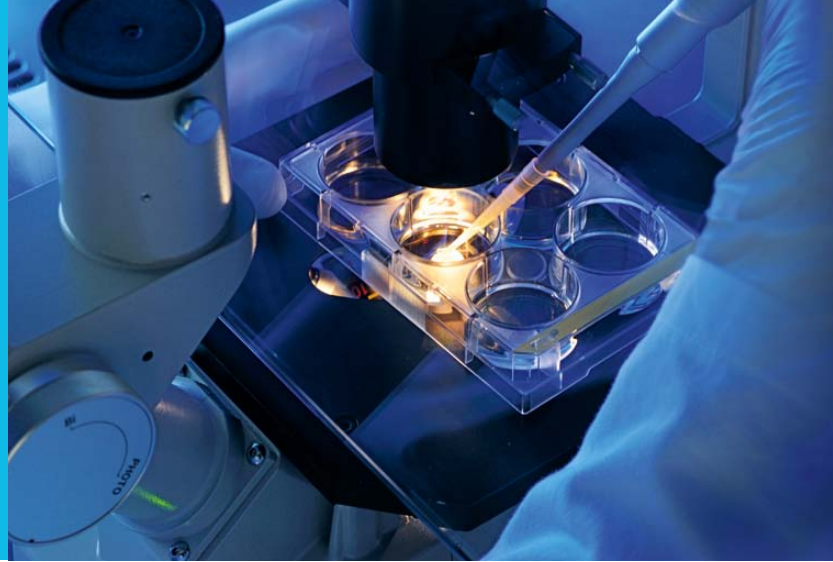
In the registration and authorization of novel biopharmaceuticals, the pharmaceutical industry has to meet stringent time and cost targets. They are often the decisive factors for a project to be successful. Traditional methods for the manufacture of production cell lines are based on random integration of the target gene into the genome. This is a very time-consuming process that can take up to 18 months. Aiming to reduce the time required for the development of cell lines, scientists of the Fraunhofer ITEM Division of Pharmaceutical Biotechnology have developed an alternative strategy. They use a targeted recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) that spawns a robust and stably producing production cell line within six weeks.

The percentage of biopharmaceutical active ingredients in medicinal products has been rising steadily. Among these are complex glycosylated proteins such as EPO and, to an increasing degree over the past few years, recombinant antibodies.

For stable production of glycoproteins the mammalian cell line CHO (Chinese Hamster Ovary) is being used almost exclusively at present. The key factor for the economic efficiency of a manufacturing process is that a high, predictable, specific, and stable expression of the recombinant target proteins can be achieved. The productivity of a cell depends, among other things, on the vector construct and the gene to be inserted, referred to as the “gene of interest” (GOI). Furthermore, the number of integrants and the site of integration (locus) of the transgene also play a role.

Traditional method – random gene integration

Traditional methods for the development of stable cell lines are often based on random integration of the GOI into the cell's genome. This results in differences in the expression behavior of the individual clones. The integration locus and its environment and the number of integrants, however, have a crucial impact on the expression level and stability. The establishment of production cell lines with satisfactory production behavior, therefore, is often linked to a time- and cost-intensive search for a suitable cell clone. The drawback of the traditional method for cell line development lies in the fact that the screening for a highly expressing clone has to be repeated for each new



protein and that due to the random integration the result is neither predictable nor can it be standardized.

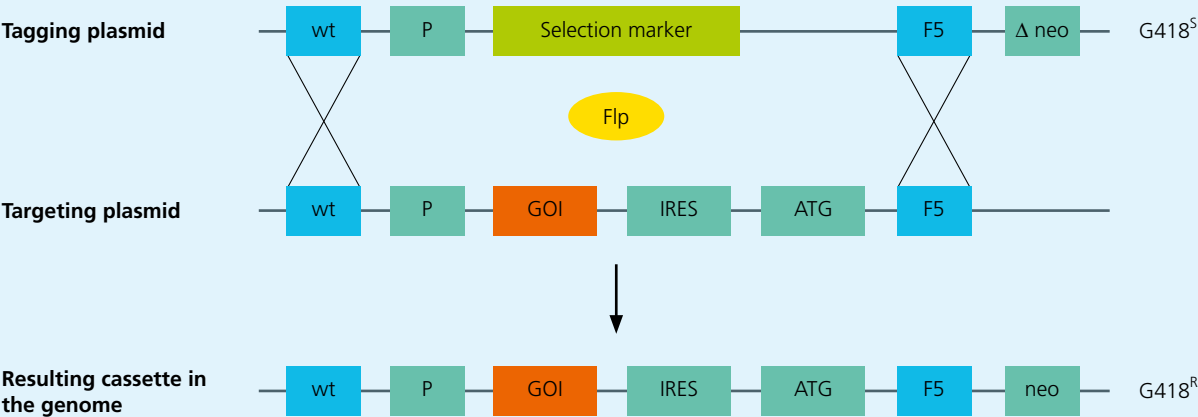
To avoid the necessity of having to create yet another cell line with specific properties for each new protein, the scientists have chosen a new route that seems to bear great potential: they are trying to integrate the GOI in a targeted manner and also exchangeably into a transcriptionally active chromosomal locus. This strategy has the enormous advantage of introducing a single copy of each GOI into the same chromosomal environment, resulting in comparable expression levels and high reproducibility. In addition, the time required to establish a new production cell line can be reduced from approximately 70 weeks to only six weeks.

New method – targeted recombinase-mediated cassette exchange

Targeted integration of a transgene into a known genomic locus is achieved by recombinase-mediated cassette exchange (RMCE). This method makes use of an FLP recombinase’s property of binding to specific recognition sequences, the FRT binding sites, and inducing DNA exchange between homologous FRT sequences. For RMCE, the FRT sequences were modified such that efficient recombination will take place only between identical recognition sequences, while FRT sites with diverging sequences will not recombine or with only little efficiency. This RMCE technique is based on two tiers: tagging and targeting. The tagging consists in a marking of the genomic locus.

Fig. 1: Principle of recombinase-mediated cassette exchange (RMCE).

A tagging plasmid carries two different FRT recognition sites: the wild-type FRT sequence and the mutated F5-FRT sequence. A promoter (P) controls the transcription of a marker. This marker enables the screening and selection of cells which include this construct. Next to the F5-FRT sequence, there is a shortened neomycin gene, so that cells carrying this tagging plasmid will be responsive to the antibiotic neomycin (G418). The cassette exchange requires a targeting plasmid which carries the gene to be inserted (GOI) and the same FRT sequences as the tagging plasmid. In addition, an IRES element (Internal Ribosomal Entry Site) is used to control transcription of the neomycin gene, whose missing start codon (ATG) is also included in the targeting plasmid. The cassette exchange is then induced by exogenous addition of FLP recombinase. The resulting construct in the cells will finally include the promoter, the GOI, the IRES element, and a complete neomycin gene, resulting in resistance to neomycin of the cells thus modified.



This means that two different and incompatible FRT recognition sites are inserted into the genome in combination with a selection marker. At the locus thus marked, a cassette exchange is then performed. The DNA region flanked by FRT sequences is replaced by a target vector (targeting plasmid) at the marked locus. This reaction is catalyzed by Flp recombinase.

The RMCE can be further refined by completing a shortened version of a selection marker in the tagging plasmid through an exchange with the target plasmid. This provides a selection method which signals successful targeting (Fig. 1).

Results

Different types of tagging plasmids were used to search for cell clones with stable and high productivity and with only a single integrant. The scientists found clones expressing up to 7 pg of a recombinant protein per cell and day. Compared to the traditional systems used for cell line development this is an excellent value, all the more since it was achieved with only a single copy in the genome. As test system, the scientists used a recombinant mouse antibody (IgG2a), and with this they were able to demonstrate that the method is basically functional in CHO cells.

Further investigations with other recombinant proteins such as interleukins or kinases are planned, so as to enable prediction of expression properties and finally develop strategies for an improvement of the genomic loci and expression levels.



CONTACT

Dr. Nathalie Veith
Phone +49 531 6181-6340
nathalie.veith@item.fraunhofer.de



Project Report

EPIGENETIC MECHANISMS IN LUNG CANCER CELLS

SUMMARY

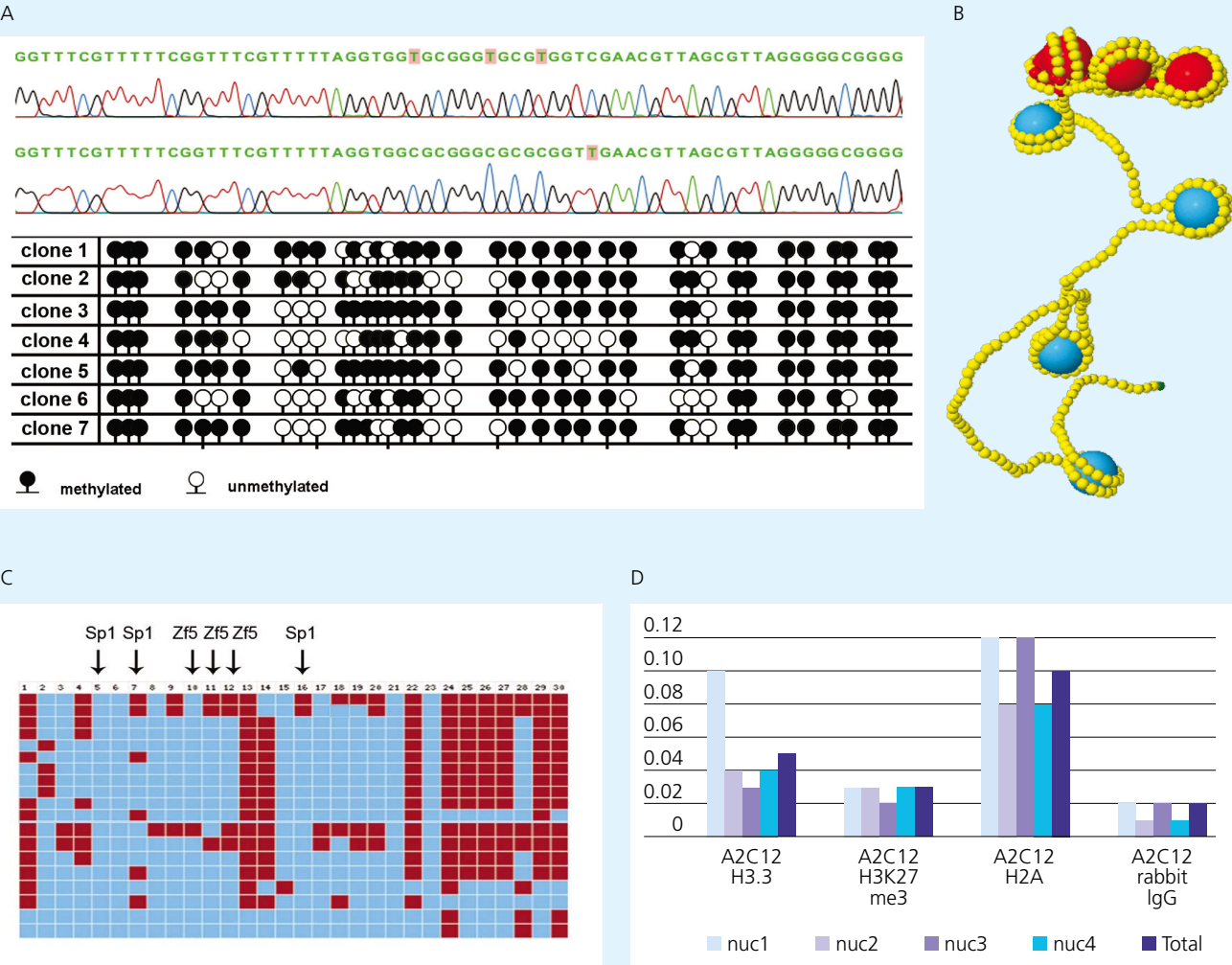
Besides genetic aberrations, misdirected epigenetic regulation has been implicated in the development of diseases, notably cancer. Epigenetic regulation, however, is complex, involving the interplay of major effectors including nucleosome positioning, DNA methylation, and histone variants. Scientists of the Fraunhofer ITEM are striving to understand this complex interplay. A panel of molecular methods have been established to enable investigation of genetic and epigenetic mechanisms that play a role in disease development and after exposure to environmental pollutants.

Epigenetic events are heritable changes in gene expression without alterations in the primary DNA sequence. They are important in normal development and differentiation, but when misdirected can lead to diseases. A well-known phenomenon in cancer is aberrant DNA methylation, resulting in epigenetic gene silencing. In contrast to genetic alterations, epigenetic processes resulting in gene silencing can be reversed. Epigenetic regulation is highly complex, involving the interplay of major effectors including nucleosome positioning, DNA methylation, histone variants, histone modifications, and non-coding RNAs. How these effectors interact with each other to affect gene expression remains unclear. Thus, knowing exactly what types of epigenetic mechanisms are in place is crucial for diagnosis and therapy.

Our DNA is packaged into a complex nucleoprotein structure in the nucleus of a cell, referred to as chromatin, and the basic repeating unit of chromatin is known as nucleosome. Each nucleosome consists of an octameric histone core, around which a DNA fragment of approximately 147 base pairs is wrapped. To better understand epigenetic mechanisms, especially those affecting chromatin packaging in lung cancer, Fraunhofer ITEM scientists analyzed the promoter region of the tumor suppressor gene *Cadm1* in different mouse lung cancer progenitor cell lines (1). They have shown previously that these lung cancer cell lines exhibit *Cadm1* promoter hypermethylation associated with transcriptional repression (2). Different from normal lung, silenced promoters of lung cancer cells displayed tight chromatin packaging, preventing remodeling and binding of proteins necessary for gene activation.

Fig. 2: Epigenetic silencing landscape in the *Cadm1* promoter region in mouse lung cancer cells.

(A) Promoter hypermethylation in different clones after bisulfite sequencing.
 (B) Predicted nucleosome positions along the promoter region.
 (C) Methylation pattern after DNA methyltransferase-based single-molecule chromatin mapping to show nucleosome occupancy.
 (D) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) to identify the presence of histone variants and histone modifications that would affect nucleosome positioning.



More important, lung cancer cells exhibited not only one but multiple key players of silencing, and this can vary in single promoters within and among different lung cancer cell lines.

At the Fraunhofer ITEM, molecular tools and know-how are available to identify both genetic and epigenetic mechanisms associated with disease and occurring after environmental exposures. These include:

- Detection of DNA polymorphisms, mutations, and other genetic aberrations by capillary sequencing, denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC), and PCR-RFLPs
- Identification of aberrant DNA methylation patterns using bisulfite-treated genomic DNA, for example, by bisulfite sequencing
- Single-molecule chromatin mapping with DNA methyltransferases to investigate nucleosome occupancy and occlusion of transcription binding sites
- Micrococcal nuclease (MNase) chromatin analysis coupled with sequencing to determine changes in nucleosome positioning
- Chromatin immunoprecipitation (ChIP) with histone variants and histone modifications to detect changes in nucleosome stability and positioning
- Assays with epigenetic drugs such as 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA methyltransferase inhibitor

References

- (1) Reamon-Buettner, S. M., and Borlak, J. (2011) Dissecting epigenetic silencing complexity in the mouse lung cancer suppressor gene *Cadm1*. (submitted for publication)
- (2) Reamon-Buettner, S. M., and Borlak, J. (2008) Epigenetic silencing of cell adhesion molecule 1 in different cancer progenitor cells of transgenic c-Myc and c-Raf mouse lung tumors. *Cancer Res* 68: 7587-7596.



CONTACT

Dr. Stella Marie Reamon-Büttner
Phone +49 511 5350-527
stella.reamon-buettner@item.fraunhofer.de

Project Report

COPD: CELL CULTURE MODEL FOR DRUG TESTING

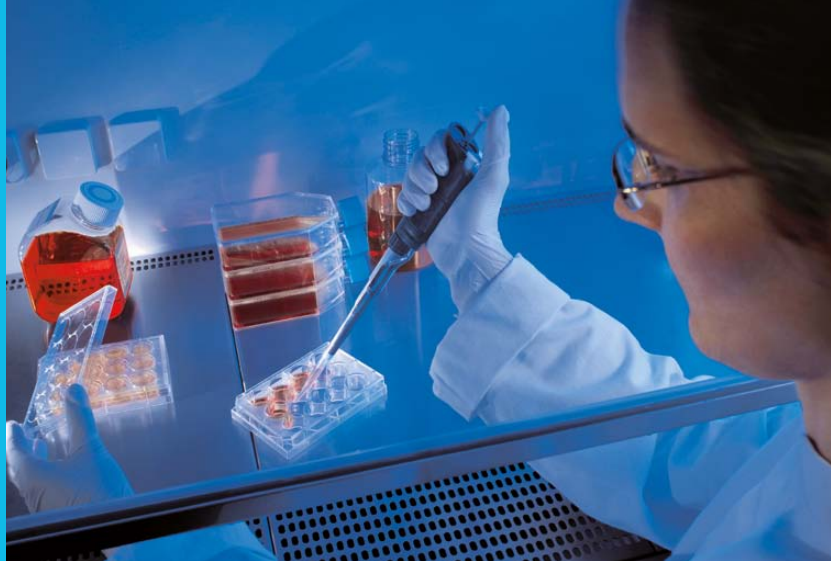
SUMMARY

Continued efforts are being made to develop an appropriate therapy for chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Drugs that are administered by inhalation and thus are delivered directly to the site of action are a promising approach. Efficient development of such medications requires in-vitro cell culture systems. Scientists at the Fraunhofer ITEM have established a model of bronchial epithelium that enables simulation of the chronic inflammatory response as it occurs in COPD. It allows the absorption of drug substances to be investigated in human bronchial epithelium.

Background

For numerous respiratory diseases, there continues to be a need for improved or tailored medications. This holds true, for example, for chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Even though this is a highly prevalent disorder, there is still no therapy that can stop its progression. A very promising approach is the use of medications that are administered by inhalation and are thus delivered directly to the site of action. To enable cost-effective and fast development of such medications, in-vitro models mimicking the airways and their inflammatory processes are required. At the Fraunhofer ITEM, such a model has been developed based on the human bronchial epithelial cell line Calu-3.

The Calu-3 cell line is a well characterized model of the lower airway epithelium, and it is frequently used to investigate absorption and transport of pharmaceutical agents in bronchial epithelium. In patients with COPD, however, the properties of the epithelial cells might be substantially altered as a result of the chronic inflammatory process that is the hallmark of this disease. The aim of this project, therefore, was to develop a Calu-3-based cell culture model that would reflect the chronic inflammatory process in the bronchial epithelium. In addition, the influence of surfactant on the absorption of pharmaceutical agents was to be studied.



Method

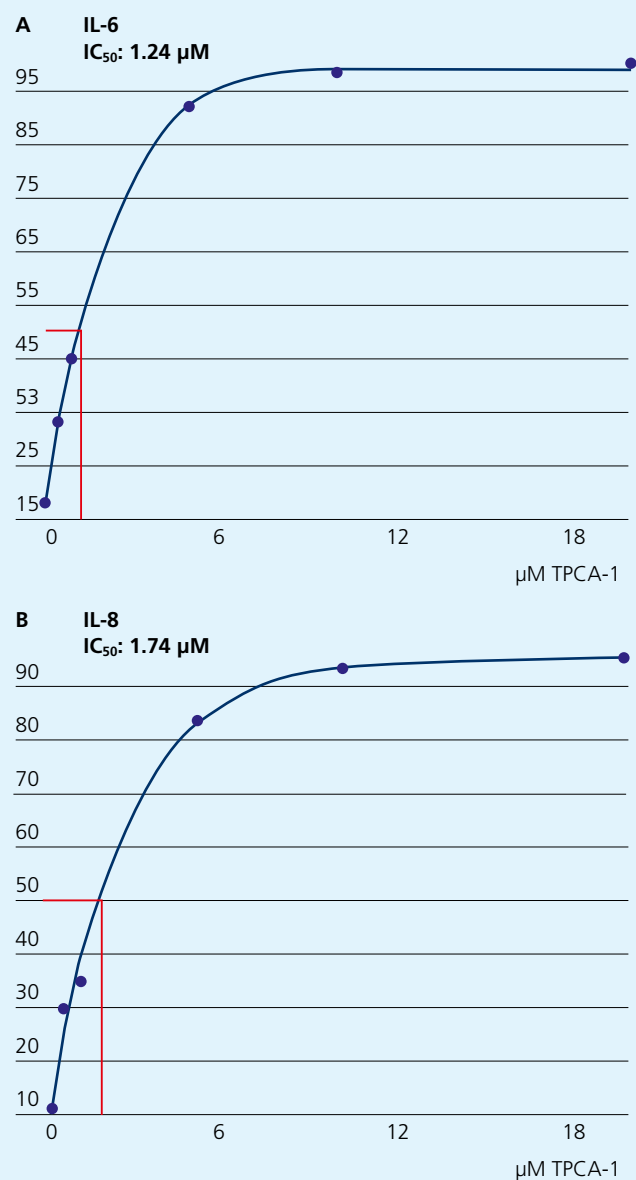
Calu-3 cells were cultured on permeable filter inserts, either at the air/liquid interface (air-interfaced culture, AIC) or under conventional culturing conditions (liquid-covered culture, LCC). The integrity of cell-cell junctions (tight junctions) was monitored by measuring the transepithelial electrical resistance (TEER). As cell-specific synthetic activity, mucin release over the culture duration was quantified. By adding lipopolysaccharide (LPS) an inflammatory response was induced in the Calu-3 cells, which was demonstrated by means of IL-6 and IL-8 release. As anti-inflammatory model substances three different signal transduction inhibitors were applied: SB 203580, a p38 MAPK inhibitor; TPCA-1, an inhibitor of IKK-2 kinase and thus of the NF κ B signaling pathway; and AS252424, a phosphoinositide 3-kinase inhibitor. Different concentrations of the signal transduction inhibitors were added to the apical compartment of the cell cultures to determine the mean inhibitory concentration (IC₅₀) necessary to curb the LPS-induced IL-6 and IL-8 release.

Results

The TEER, which is a measure of the tightness of tight junctions, was higher under LCC conditions throughout the culture duration (2 weeks). The highest TEER values were measured on day 11.

In non-stimulated cultures under AIC conditions, IL-6 release was considerably lower than IL-8 release, while cells in AIC produced significantly more IL-8 than cells in LCC at all investigated time points. Adding LPS allowed a reproducible, dose-dependent increase in IL-6 and IL-8 release to be induced. As this effect was more pronounced under LCC conditions, all further experiments were conducted in LCC.

Fig. 1: Inhibition of the release of inflammatory cytokines IL-6 (A) and IL-8 (B) by adding increasing concentrations of TPCA-1, an inhibitor of IKK-2 kinase and thus of the NF κ B signaling pathway.



The MAPK inhibitor SB 203580 inhibited LPS-stimulated IL-6 release (IC_{50} : 0.7 μ M), but did not affect the release of IL-8. TPCA-1, an inhibitor of the NF κ B signaling pathway, inhibited the release of both interleukins (Fig. 1) with IC_{50} values of 1.2 μ M (IL-6) and 1.7 μ M (IL-8). In contrast, the phosphoinositide 3-kinase inhibitor AS252424 had no impact on the two cytokines that were measured. Simultaneous addition of lung surfactant (Curosurf®) resulted in neutralization of the inhibitory effect of TPCA-1 and SB 203580.

Conclusion

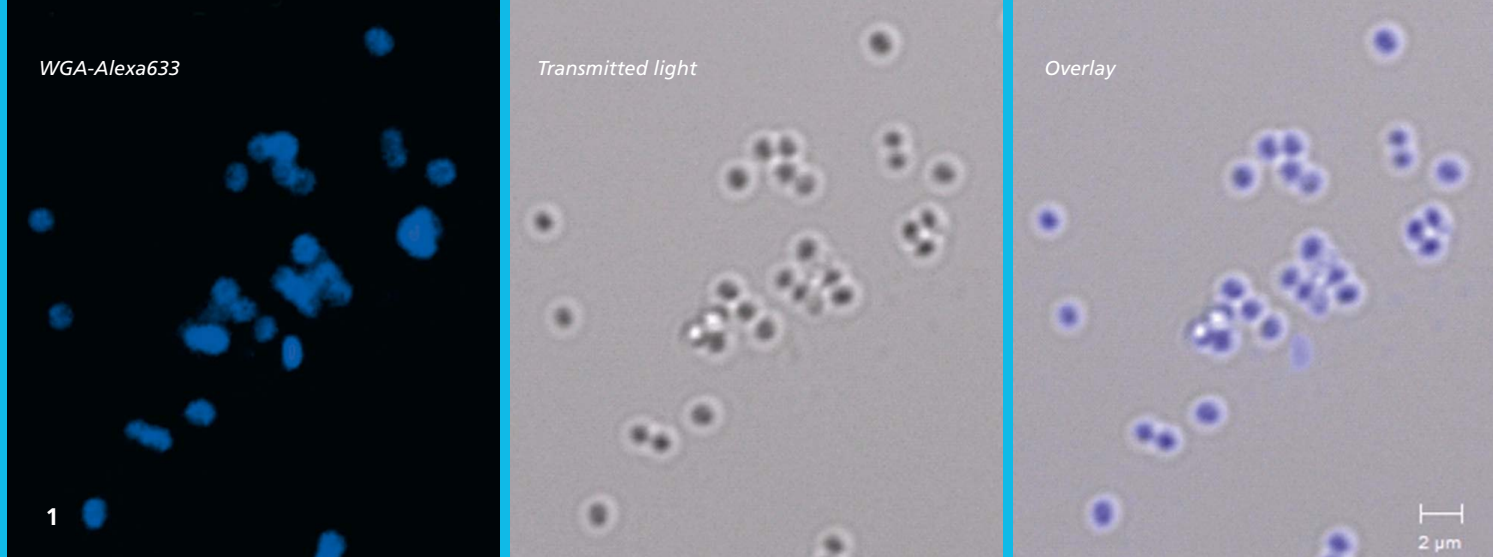
Calu-3 cells can be used as an in-vitro model of the bronchial epithelium in COPD patients, offering the possibility to mimic the chronic inflammatory response. This cell culture model represents a promising screening system for inhalation medications. As was demonstrated by way of the examples of TPCA-1 and SB 203580, the absorption behavior of pharmaceutical agents can be strikingly different in the presence of lung surfactant. Pulmonary in-vitro models, therefore, should take into account the influence of surfactant.

This project was funded under the Johnson & Johnson “Exploratory Healthcare Research Program”.



CONTACT

Dr. med. vet. Tanja Hansen
Phone +49 511 5350-226
tanja.hansen@item.fraunhofer.de



Project Report

FRAUNHOFER PROJECT “AESKULAP”: DEVELOPMENT OF A FAST AND RELIABLE DIAGNOSTIC METHOD FOR SEPSIS

SUMMARY

Sepsis – colloquially also referred to as “blood poisoning” – is the third leading cause of death in Germany. A patient with sepsis immediately receives treatment with a broad-spectrum antibiotic, a therapy that is not always optimal. Broad-spectrum antibiotics are used in this case, because considerable time is required to identify the causative pathogens and their possible antibiotic resistances, and this delay in the onset of treatment would increase the threat to the patient’s life. In the collaborative project “Aeskulap”, scientists of the Fraunhofer institutes FIT, IMPS, ILT, and ITEM are developing a technology that will allow faster identification of pathogens and quicker testing for resistances – to enable rapid and safe treatment of sepsis patients in the future.

Traditionally, to confirm sepsis and identify the causative agents cell cultures are prepared from blood samples – a method that requires considerable time, and time is critical in the treatment of sepsis. In the joint research project “Aeskulap”, scientists of the Fraunhofer institutes FIT, IMPS, ILT, and ITEM are now striving to develop a faster diagnostic method. They first want to stain the pathogens with different colors by using specific antibodies and then sort them with a microfluidic separation system. The bacteria subsequently are to be grown under optimized culturing conditions and shall then be tested for their sensitivity to antibiotics. The culturing process is planned to be complete within six hours maximum. Up to now, this culture has been the most time-consuming step, and the aim is to shorten this process, so as to considerably speed up the identification of the infectious agent and of its possible resistances to antibiotics – and to eventually enable targeted treatment of the patient with selected antibiotics.

1 Antibody staining of the Gram-positive pathogen *Staphylococcus aureus*. Comparison of different microscopic images shows that this staining method specifically stains all bacteria on the prepared slide. From left to right: fluorescence staining with Alexa 633, transmitted light image for comparison, and finally an overlay of the fluorescence image and the transmitted light image.



Search for specific antibodies against the causative agents of sepsis

The Fraunhofer ITEM scientists first selected a variety of pathogens that cause more than 95 percent of all cases of sepsis: Gram-positive germs of the species *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, and *Enterococcus faecalis*, and Gram-negative agents such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*. Pure cultures of these clinically relevant pathogens were started under S2 conditions in the Fraunhofer ITEM safety lab, and these were used for all subsequent investigations.

To make sure the pathogens can be reliably diagnosed, the scientists want to stain them with specific antibodies that will enable their unequivocal identification in a fluidic sorter. To this end, experiments with staining protocols that allow pathogens to be stained without compromising their subsequent viability have been conducted, to enable performance of the intended ensuing cultures. For the staining, commercially available antibodies were selected and tested for specificity. To ensure proper functioning of the sorter, the selected antibodies must recognize exclusively the target organism and must not (or only to a low degree) bind to other species of bacteria. This is a problem with many antibodies, because their general experimental use frequently does not require precise specificity testing. Therefore, all antibodies used in the "Aeskulap" project have to be subjected to comprehensive testing. Whether or not a stain is specific and marks exclusively the desired pathogen is being verified both by flow cytometry and laser scanning microscopy.

Up to now, the scientists have found a specifically staining antibody against *Staphylococcus aureus*, whose specificity they were able to demonstrate both by flow cytometry and microscopy (Fig. 1). This antibody binds exclusively to the target organism and leaves other bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* unstained. Furthermore, differentiation between Gram-positive and Gram-negative pathogens according to their surface characteristics by means of fluorescence-coupled staining could be demonstrated. Viability of the investigated bacteria, and thus their growth kinetics, was not affected by the antibodies and staining methods used. This is an important prerequisite to enable establishment of valid antibiotic testing in the subsequent culture. The possibility to quickly test antibiotics in microformat is another essential precondition for an acceleration of the entire process.

Outlook

By demonstrating the specificity of a particular staining protocol and uncompromised viability of the bacteria after the staining process, an important step in the development of the microfluidic sorter has been successfully accomplished. The tasks to be tackled in the near future include miniaturization of the bacterial culturing conditions and validation of the testing for antibiotic resistances in miniaturized format.



CONTACT

Dr. Meike Müller
Phone +49 511 5350-262
meike.mueller@item.fraunhofer.de

Business Unit 1

PROJECT OVERVIEW

Immunotoxicological
evaluation of metals

Efficacy of biopharmaceutical
drugs in primates

Evaluation of the toxicity
of airborne pollutants in
precision-cut lung slices

Drug testing in mouse and
rat asthma models including
lung function measurements

Drug testing in infection
models

Drug testing in mouse and
rat models of LPS-induced
inflammation

Testing of plant-based drugs
in models of inflammation

In-vitro testing of plant-based
drugs

Development of a cell culture
model to test drugs for COPD
treatment

In-vivo and ex-vivo imaging
of the immune response by
2-photon microscopy

Safety pharmacology of
the lung

Testing of bronchodilator
drugs

Pulmonary effects of
nanoparticles

Detection of infectious agents
in blood samples and on
medical equipment

Tumor therapy by using
supply-independent
implantable micro-dosing
systems (TUDOS)

Development of a platform
for GMP-grade manufacture
of recombinant antibodies
based on microbial cultures
and mammalian cell cultures

Development of a platform
for GMP-grade manufacture
of nucleic acids/DNA-based
agents

Operation of a clean-room
unit for aseptic fill and finish
of investigational medicinal
products based on infusion
solutions

GMP-compliant manufacture
of investigational provocation
substances for use in clinical
trials in the Department of
Clinical Airway Research

Development of a GMP-
compliant manufacturing
process for fungal cell banks
based on spore suspensions

2



CLINICAL AIRWAY RESEARCH



Project Reports

Universal allergen challenge method validated in the Fraunhofer ECC

Reproducible inflammatory response after segmental endotoxin challenge in healthy volunteers

RIBOLUTION: novel biomarkers for diagnosis and therapy

Preliminary Research

Non-invasive quantification of airway inflammation by magnetic resonance imaging

Low-dose endotoxin inhalation challenge – a model for early-phase clinical drug development

Pilot study: effects of grass pollen on the skin condition of patients with atopic dermatitis

Project Overview



Clinical studies to test the efficacy of new pharmaceuticals, to develop novel biomarkers, and to assess the potential hazards of pollutants in the air are conducted in the business unit Clinical Airway Research. In this field, the Fraunhofer ITEM closely cooperates with the Hannover Medical School as well as with industry and different research institutions.

Clinical studies are a major focus of work in this business unit. According to the guidelines of Good Clinical Practice (GCP), clinical trials with volunteers and patients to evaluate the efficacy and safety of new anti-obstructive and anti-allergic drugs are carried out, with the main emphasis being placed on the design and conduct of early-phase clinical trials (phases I and II). The efficacy of new anti-allergic drugs in patients with hay fever can be tested in the Fraunhofer Environmental Challenge Chamber (Fraunhofer ECC), a grass pollen exposure room that provides controlled allergen challenge conditions and is operated in cooperation with the Department of Aerosol Technology. To test the efficacy of a specific immunotherapy, test subjects are also exposed to house dust mite allergens in the Fraunhofer ECC. Due to the universal patented aerosol generation



technology, it will also be possible in the future to conduct tests with other allergens, such as cat dander or birch pollen. Another focus of the clinical research activities is on bronchoscopic examinations after inhalation or instillation of allergens, endotoxin, or pharmaceuticals. Only few institutions worldwide have at their disposal comparable expertise and technical facilities.

Under a special research program (SFB 587: "Immune Reactions of the Lung in Infection and Allergy") sponsored by the German Research Foundation (DFG) and within the German Center for Lung Research, clinical research projects are conducted in this business unit to investigate the pathomechanisms of the allergic inflammation in the lung and to develop novel biomarkers.

Cutting-edge technology and high professional expertise are the outstanding features of this business unit. Its current core competencies include research methods of respiratory medicine and allergology, clinical drug trials for the indications allergy, asthma, and COPD, as well as aerosol process technology and aerosol analytics.

CONTACTS



Prof. Dr. med. Norbert Krug
Phone +49 511 5350-602
norbert.krug@item.fraunhofer.de



Prof. Dr. med. Jens Hohlfeld
Phone +49 511 5350-604
jens.hohlfeld@item.fraunhofer.de

Project Report

UNIVERSAL ALLERGEN CHALLENGE METHOD VALIDATED IN THE FRAUNHOFER ECC

SUMMARY

Fraunhofer researchers have developed a universal nasal challenge method that is independent of the allergen used. They reconstituted licensed allergen extracts in appropriate lactose solutions and aerosolized these by a technique referred to as spray drying for subsequent use in studies with volunteers. The efficacy and safety of this novel challenge method was demonstrated in a clinical study with 18 patients suffering from house dust mite allergy and presenting symptoms of perennial allergic rhinitis.

The prevalence of allergic conditions is increasing worldwide. A very important form of treatment is specific immunotherapy aimed at tolerance development. The testing of novel specific immunotherapeutics under ambient conditions in allergic patients is often hampered by the variability of the allergen season and of allergen concentrations in the environment. Development of a universal allergen challenge method in the Fraunhofer Environmental Challenge Chamber (Fraunhofer ECC) could substantially contribute to standardizing allergen challenge and accelerating drug development. The allergen used for the challenge would then be exchangeable and could be selected specifically for the immunotherapy under investigation.

Allergen lyophilisate is aerosolized by spray drying

By means of spray drying, a solution of a licensed, commercially available allergen lyophilisate is aerosolized in a 10% lactose solution used as excipient. This technique generates aerosol particles with a size larger than 10 μm , which are deposited preferably in the nose and not in the lung. The desired allergen concentration in the 47-m² challenge chamber is controlled from outside the chamber via an infusion pump. Besides the size distribution of particle mass, the temperature, relative humidity and air exchange rate, the particle count is continuously monitored. By means of an established filter sampling procedure the total mass concentration of the aerosol is determined, and the allergen content of the aerosol is measured by ELISA.



1

1 During the challenge studies in the Fraunhofer ECC, the lung function of the test subjects is monitored regularly by the medical staff.

Efficacy and safety of the challenge method shown in a clinical study

Aiming to validate this challenge method for future drug trials, a single-blind, placebo-controlled clinical study was performed, partly funded by the company Allergopharma. Eighteen patients with dust mite allergy underwent exposure in the Fraunhofer ECC. For four hours each on five occasions, with intervals of at least one week in between, they were exposed to three common real-life concentrations (250-1000 SQ-E/m³) of the house dust mite allergen Der-p1, a repetition of an already known Der-p1 concentration, or 10% lactose solution as placebo. The severity of symptoms was graded by means of a symptom score (itchy nose, nose running, sneezing, and nasal congestion), and the amount of nasal secretion was measured. As a safety parameter, the lung function of the test subjects was monitored regularly.

Allergen concentrations and particle sizes were constant throughout the exposure duration. The allergen particles generated with the spray-drying method had a diameter of 13 µm. Only 11 percent of these allergen particles were smaller than 10 µm in size. Pulmonary side effects were not induced. Analysis of the nasal symptom score showed that

1. all allergen concentrations used caused similar degrees of symptoms in the target organ, the nose,
2. symptoms were reproducible when using the same allergen concentration, and
3. the score differed significantly from the placebo group.

A dose-response relationship, however, could not be established by means of the allergen concentrations used in the pilot study.

Conclusion

The new challenge method is effective and safe. It provides a very good basis for using this challenge method in clinical trials with well-controlled allergen exposure.



CONTACT

Katrin Luer

Phone +49 511 5350-621

katrin.lueer@item.fraunhofer.de

Project Report

REPRODUCIBLE INFLAMMATORY RESPONSE AFTER SEGMENTAL ENDOTOXIN CHALLENGE IN HEALTHY VOLUNTEERS

SUMMARY

Proof of concept studies that use challenges with an inflammatory stimulus are a hallmark in early clinical drug development of anti-inflammatory compounds. Segmental lipopolysaccharide (LPS) challenge can be used to induce airway inflammation in healthy subjects. It allows the precise administration of LPS to a specific lung region and vehicle challenge of a different segment within the same individual. The response to LPS may vary between and within individuals, an important fact that should be taken

into consideration in the design of clinical trials. Therefore, the aim of this study was to assess intra- and inter-individual variability of the inflammatory response to LPS at two different time points after the challenge. We observed the maximum cytokine response at 6 hours, while the cellular influx of neutrophils and monocytes was more pronounced 24 hours post LPS challenge. The segmental LPS challenge model was shown to be suited for proof of concept studies with airway neutrophilia as primary endpoint, as suggested by a repeatable >50-fold increase in neutrophils 24 hours post challenge.



Introduction

There is an unmet need for novel anti-inflammatory drugs for COPD patients. Proof of concept studies in healthy subjects are conducted first to avoid disease-related variability and minimize the exposure of humans to a new chemical compound prior to defining its potential for clinical efficacy. LPS, a major component of the outer membrane of bacteria, binds to toll-like receptor 4 (TLR4) and induces an acute inflammatory response that resembles the pattern observed in the chronically inflamed airways of COPD patients. This response is dominated by an influx of neutrophils and monocytes as well as by an increase in the concentration of pro-inflammatory cytokines.

In this study, Fraunhofer ITEM scientists assessed the intra- and inter-individual variability of the inflammatory response to LPS at two different time points after LPS challenge in order to further characterize and validate the segmental LPS challenge model.

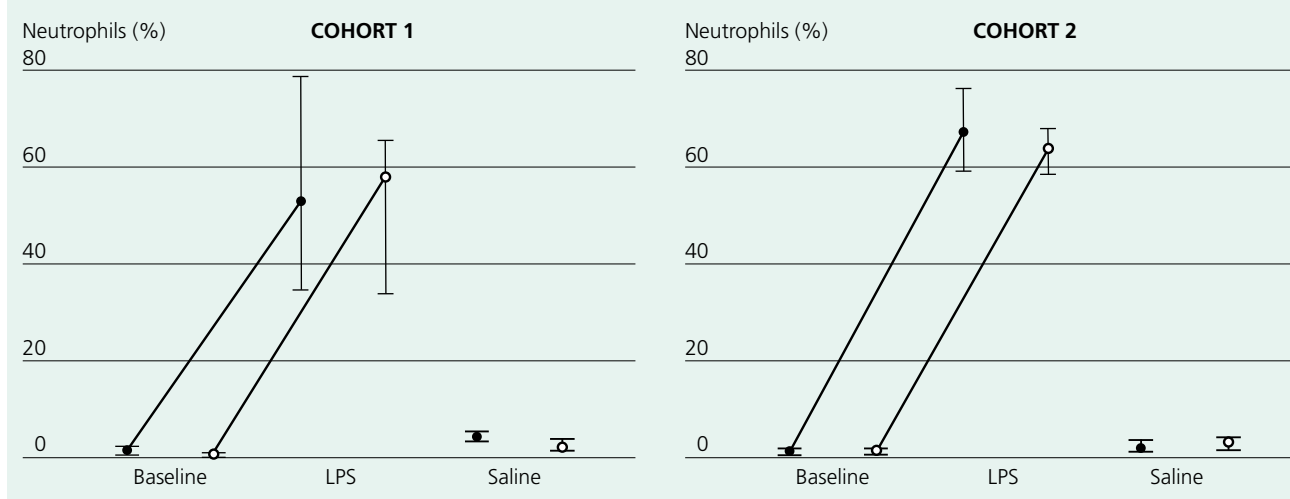
Methods

Two cohorts with ten subjects each underwent two segmental LPS challenges within four weeks. The subjects of both cohorts underwent baseline bronchoscopy with bronchoalveolar lavage (BAL) of one segment, instillation of LPS into the right middle lobe, and instillation of saline into a contralateral lung segment. The inflammatory response was evaluated in BAL fluid 6 hours (cohort 1) and 24 hours (cohort 2) post challenge. The systemic effects of the challenge were evaluated in serum up to 26 hours post challenge.

Results

The mean percentage and number of neutrophils and monocytes were increased after LPS challenge compared to treatment with saline (Fig. 1 and 2). The increase in inflammatory cells was reproducible (intraclass correlation coefficient > 0.65), as was the BAL concentration of MCP-1 6 hours post challenge and of lactoferrin, GRO- α , and ENA 24 hours post challenge.

Fig. 1: Percentage of neutrophils in BAL fluid at baseline and after segmental LPS challenge. The variability of the response is higher 6 hours (cohort 1) than 24 hours after challenge (cohort 2). Filled symbols: data of the first challenge. Open symbols: second challenge 4 weeks later. No increase in neutrophils was observed in the saline-challenged segment.

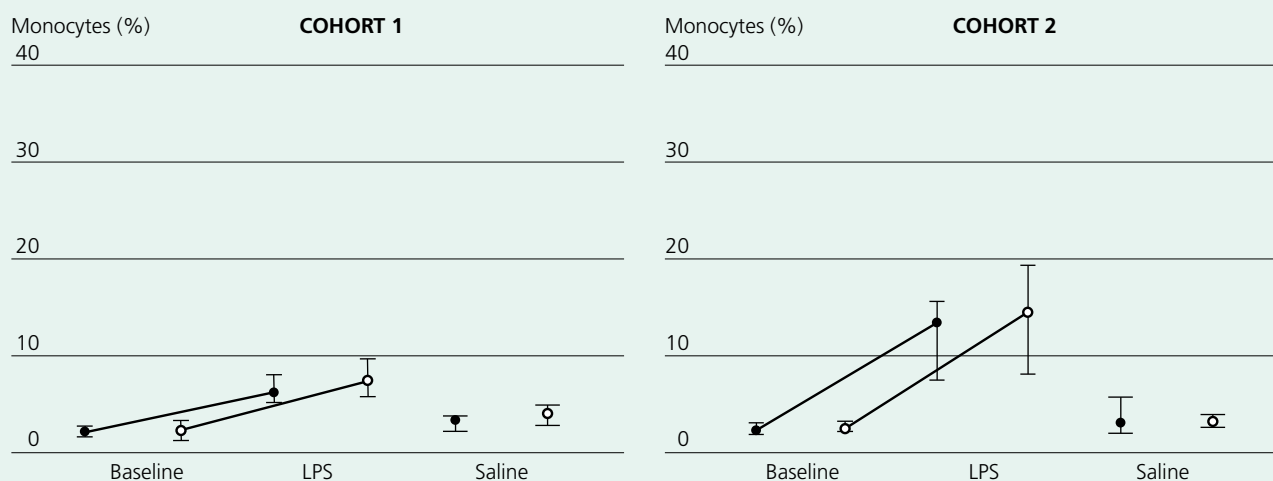


Serum concentrations of CC16, IL-6, lactoferrin, MCP-1, and MIP-1b were clearly increased after LPS challenge in both cohorts. Serum CRP was significantly increased the day after LPS challenge, with higher values in cohort 1 potentially indicating a response to the baseline BAL procedure. No systemic effects of LPS were seen for L-selectin and SP-D.

Conclusion

The segmental LPS challenge model was shown to be suited for proof of concept studies. By providing comprehensive data for the intra- and inter-individual variability of the inflammatory response to instilled LPS, the design of future clinical trials can be improved. Furthermore, the data obtained in this study will help to choose the appropriate time point for individual markers. Finally, this study demonstrated a reproducible systemic response with specific kinetics for individual markers, which will help in the future to monitor the inflammatory response after segmental LPS challenge in a less invasive way.

Fig. 2: Percentage of monocytes in BAL fluid at baseline and after segmental LPS challenge. Filled symbols: data of the first challenge. Open symbols: second challenge 4 weeks later.



CONTACT

Dr. Olaf Holz
 Phone +49 511 5350-323
olaf.holz@item.fraunhofer.de

Project Report

RIBOLUTION: NOVEL BIOMARKERS FOR DIAGNOSIS AND THERAPY

SUMMARY

With RIBOLUTION – a project of the Fraunhofer-Zukunftsstiftung (Fraunhofer Future Foundation) – a cross-disciplinary research program in the area of molecular diagnostics was started at the beginning of 2011. Five Fraunhofer institutes, one of which is the Fraunhofer ITEM, have teamed up to explore a novel class of molecules for biomarker development: non-coding RNAs (ncRNAs). Due to their high specificity, these molecules are expected to be excellently suited as biomarkers for disease diagnosis and treatment monitoring. The intended contribution of the Fraunhofer ITEM is to identify and validate a prognostic biomarker for chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Towards personalized medicine

The ongoing demographic change represents an enormous challenge for our healthcare system. In an increasingly older population, the number of cancer patients in particular is growing, and there is an increasing prevalence of chronic inflammatory and degenerative diseases. In order to cope with these problems and the resulting costs, early detection of diseases and individualized treatment are crucial. Such a personalized medicine, however, requires efficient diagnostic methods that make use of molecular biomarkers. Both for clinical diagnostics and for clinical trials of the pharmaceutical industry, there is an increasing need for such specific biomarkers. At present, though, the number of novel validated biomarkers is unable to keep pace with the skyrocketing demand.

The project RIBOLUTION (Innovative Ribonucleic Acid-based Diagnostic Solutions for Personalized Medicine) – a cross-disciplinary research program of five Fraunhofer institutes – is aimed at exploring a novel class of molecules with a great but, as yet, largely unexploited potential for use as biomarkers: non-coding RNAs (ncRNAs). ncRNAs serve important functions: they regulate genes that provide the blueprint for protein production and can thus be looked upon as “control software”. The aim of the RIBOLUTION project is to develop methods and techniques that will enable efficient identification and validation of these molecular biomarkers. The intended result is an automated process which, due to its high degree of process and quality control and its end-to-end documentation,



is capable of being certified and will set new standards for research and industry.

RIBOLUTION – a cross-disciplinary project

In this Fraunhofer joint research project, the Institute for Toxicology and Experimental Medicine ITEM, the Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology IGB, the Institute for Manufacturing Engineering and Automation IPA, and the Institute for Applied Information Technology FIT are collaborating under the leadership of Professor Friedemann Horn from the Institute for Cell Therapy and Immunology IZI. Scientists are working to set up a modular and flexible automation system for ncRNA analysis that will provide quick answers to any questions regarding biomarkers. Their objective is a system with seamless in-line process and quality control for the screening of large cohorts. In addition, highly sensitive nucleic acid sensors are to enable identification of individual nucleic acid-based biomarkers.

Besides the innovative technology of the screening platform that is being established, the biomarkers that will be developed in this project also bear a special exploitation potential. The fact that the focus is being placed on ncRNA molecules guarantees access to a huge pool of potential markers which for the most part have not yet been characterized.

The effectiveness of the process is to be demonstrated by means of three prototype diseases: the ambition is to develop a prognostic biomarker for chronic obstructive pulmonary disease (COPD), a marker for early detection of prostate carcinoma, and a marker supporting treatment selection in rheumatoid arthritis. The selected diseases are of great social and economic relevance, and they have in common that there are still quite a few unanswered questions regarding their diagnosis and/or treatment selection.

COPD – markers for diagnosis and therapy

The Fraunhofer ITEM is bringing in its clinical expertise in the area of COPD. As part of the RIBOLUTION project, a Fraunhofer COPD cohort with different severities of the disease will be set up and characterized, and the potential of ncRNA biomarkers will be analyzed in this group. Furthermore, in cooperation with GlaxoSmithKline the potential of ncRNA markers will be studied and validated in a large existing and already characterized COPD cohort, the ECLIPSE cohort.

The total project is composed of two three-year phases. During the first phase, the automated process chain will be developed on the one hand, and on the other hand the screening of biomarkers will be started, initially by using a conventional manual method which during the last period of this phase will be compared with the automated process. The second phase of the project will open up the possibility to identify and validate biomarkers for other indications faster, more efficiently, and more cost-effectively by means of the largely automated screening process. It is planned to form a patent cluster at different levels of biomarker development, ranging from the actual markers to the technical solutions for the automation and measurement technology.

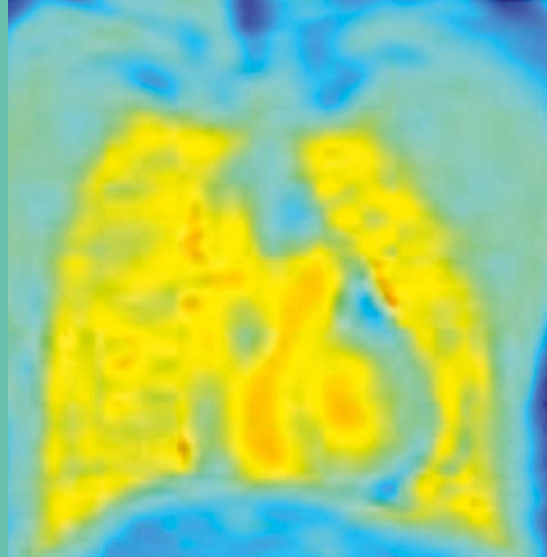


CONTACTS

Prof. Dr. med. Norbert Krug
Phone +49 511 5350-602
norbert.krug@item.fraunhofer.de



Dr. Claus-Dieter Kroggel
Phone +49 511 5350-103
claus.kroggel@vls.fraunhofer.de



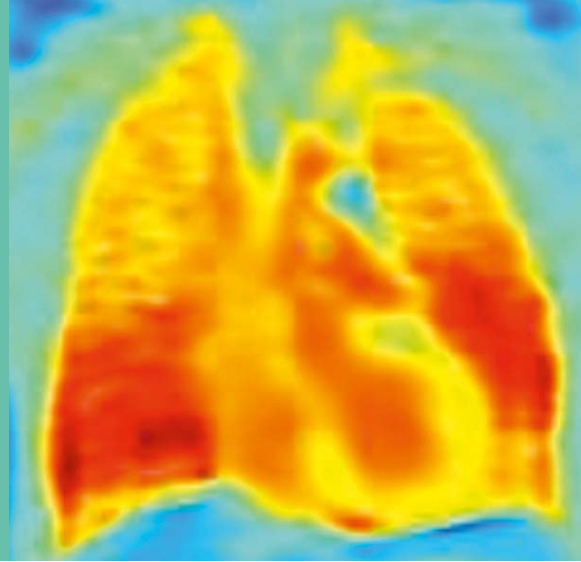
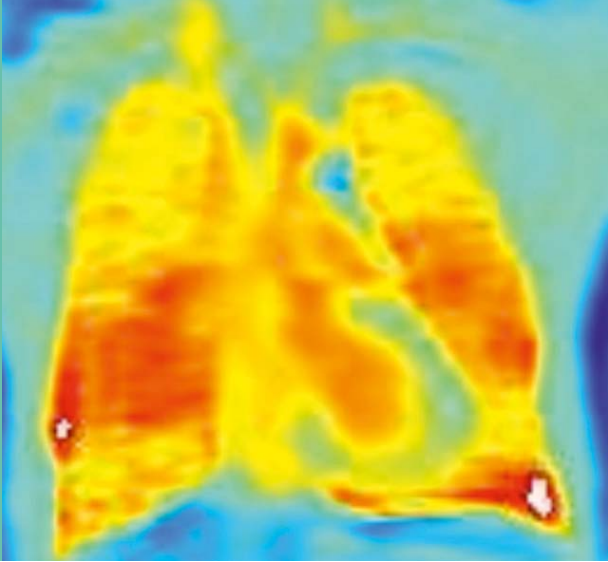
Preliminary Research

NON-INVASIVE QUANTIFICATION OF AIRWAY INFLAMMATION BY MAGNETIC RESONANCE IMAGING

SUMMARY

The testing of novel medications to treat inflammatory airway diseases often includes the use of methods that induce an allergic response, for example, segmental challenge with allergens introduced into the airways during bronchoscopy. Up to now, the severity of the local allergic inflammation has been determined by means of bronchoalveolar lavage. Scientists of the Fraunhofer ITEM are now exploring whether the local inflammatory responses can also be demonstrated with a non-invasive method: magnetic resonance imaging. First results have shown that this is possible.

Non-invasive detection and monitoring of the airway inflammation in inflammatory airway diseases such as bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is of crucial importance both for treatment control and in evaluating the efficacy of novel medications. Efficacy testing of new pharmaceuticals during early-phase drug development often involves the use of challenge methods that mimic severe illness or a disease crisis with massive deterioration of signs and symptoms. In patients with bronchial asthma, these methods include not only allergen challenge by inhalation, but also segmental allergen challenge performed during bronchoscopy. Local demonstration of the inflammation by non-invasive techniques is a special challenge here. It is the aim of an ongoing research project conducted in cooperation with the Institute for Diagnostic and Interventional Radiology of the Hannover Medical School to explore whether the local inflammation induced by segmental allergen challenge can be detected and quantified by magnetic resonance imaging (MRI).



To this end, patients with mild bronchial asthma are subjected to segmental allergen challenge during bronchoscopy. Magnetic resonance imaging of the lung with acquisition of different sequences is performed before allergen challenge and 6 and 24 hours thereafter (Fig. 1). Another bronchoscopy including bronchoalveolar lavage (BAL) is performed after 24 hours to determine the severity of the local inflammation. The inflammatory response on the cellular level is then compared with changes observed in the MR images.

First results have shown that the local allergic inflammation can be detected in the MR images. Semi-quantitative grading of the severity of inflammation by means of the images correlated with the grading of the cellular inflammatory response in the BAL fluid. The aim is to develop an MRI-based method for time-resolved mapping of the local airway inflammation after segmental allergen challenge. The results of the pilot study will be presented during the Annual Meeting of the American Thoracic Society in May 2012.

1 *MR images (T1-weighted) acquired before (left), 6 hours (middle) and 24 hours (right) after segmental allergen challenge in the medial lobe and in the lingula (images courtesy of Priv.-Doz. Dr. Jens Vogel-Claussen, Institute for Diagnostic and Interventional Radiology, Hannover Medical School).*



CONTACT

Prof. Dr. Jens Hohlfeld
Phone +49 511 5350-604
jens.hohlfeld@item.fraunhofer.de

Preliminary Research

LOW-DOSE ENDOTOXIN INHALATION CHALLENGE – A MODEL FOR EARLY-PHASE CLINICAL DRUG DEVELOPMENT

SUMMARY

In the Department of Clinical Airway Research, endobronchial administration of allergen or the endotoxin lipopolysaccharide (LPS) has been established as challenge models that have successfully been used in early-phase development of novel anti-inflammatory drugs. While these challenges require the use of invasive bronchoscopy, challenge agents can also be inhaled to induce inflammatory processes. Inhalation challenge with endotoxin is not invasive, however, it requires a large amount of endotoxin (15–50 µg) – about 100 times the amount required to obtain a comparable effect by endobronchial challenge. Such large quantities of GMP-grade endotoxin are not available. Fraunhofer ITEM scientists, therefore, are currently exploring a novel inhalation method with a highly efficient lung deposition rate that could reduce the necessary amount of endotoxin to only 2 µg.

Twelve healthy volunteers (non-smokers, mean age: 38 ± 11 years, FEV_1 : $104.2 \pm 7.3\%$ pred.) inhaled 2 µg LPS, which was nebulized using an Aeroneb solo (Inspiration Medical) nebulizer in conjunction with standardized inhalation maneuvers (mass flow 150 ml/sec, endotoxin aerosol bolus of 750 ml with subsequent inhalation of 300 ml clean air). Sputum was induced six hours after LPS challenge and the cellular composition was compared with the baseline values (screening visit 2–4 weeks prior to the challenge visit). Body temperature and exhaled breath temperature were assessed prior to as well as three hours and six hours post challenge.

The LPS inhalation was well tolerated with no adverse effects. There was a small but significant ($p = 0.005$) transient change in lung function one hour after LPS inhalation (median (IQR): 95.9% (90.8%, 100%) of the pre-challenge value). Exhaled breath temperature and body temperature were significantly increased six hours post challenge. The percentage of neutrophils in sputum was increased compared to baseline ($p = 0.003$, see Fig. 1). Furthermore, an increase in monocytes ($p = 0.01$) and total cell numbers per milliliter sputum ($p = 0.002$) was observed.

Conclusion

Low-dose endotoxin inhalation is sufficient to induce a significant influx of neutrophils and monocytes into the airways. In the second part of this study, the reproducibility and suitability for pharmacological modulation of this response will be assessed to validate this model for proof of concept studies in the early development of novel anti-inflammatory compounds.



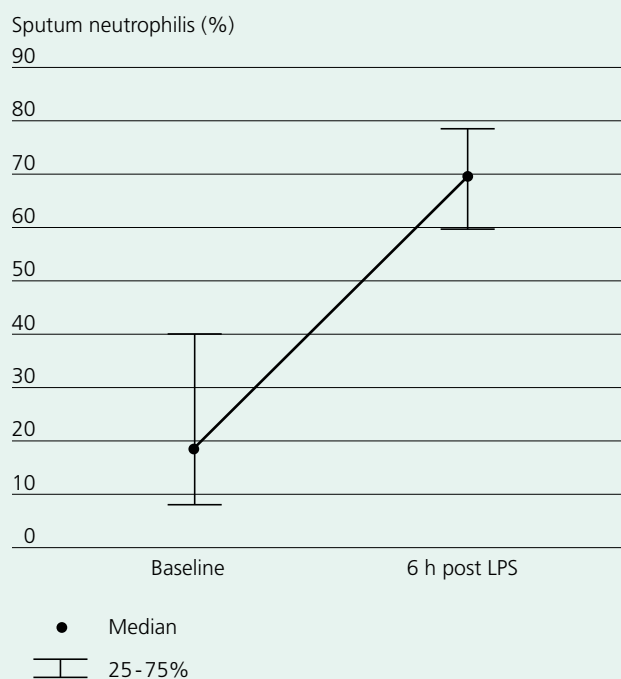
CONTACTS

Dr. Olaf Holz
Phone +49 511 5350-323
olaf.holz@item.fraunhofer.de



Dr. Frank Schaumann
Phone +49 511 5350-680
frank.schaumann@item.fraunhofer.de

Fig. 1: Increase in the percentage of sputum neutrophils after LPS inhalation challenge in healthy subjects (n = 12).





Preliminary Research

PILOT STUDY: EFFECTS OF GRASS POLLEN ON THE SKIN CONDITION OF PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS

Patients with atopic dermatitis (neurodermatitis) who manifest allergic sensitization often display more severe skin alterations than non-allergic patients. The seasonal worsening they experience suggests in addition that contact with pollen allergen in particular results in a deterioration of the skin condition. Scientific evidence for the hypothesis that grass pollen can cause the disease to flare up in sensitized patients with atopic dermatitis, however, has yet to be provided. In an ongoing double-blind, placebo-controlled study with parallel groups, scientists of the Fraunhofer ITEM and the Hannover Medical School Clinic for Dermatology, Allergology and Venerology are exploring this issue by investigating the effects of grass pollen exposure in the Fraunhofer Environmental Challenge Chamber (ECC) on the skin condition in patients with atopic dermatitis. After an initial screening examination to ensure that they meet the study inclusion criteria, the participating patients will be exposed in the Fraunhofer ECC for four hours each on two consecutive days either to grass pollen or to clean air (placebo). On the following three days, the condition of the patients' skin will be evaluated at the Fraunhofer ITEM.

If this study demonstrates that grass pollen exposure in the Fraunhofer ECC leads to a significant worsening of the skin condition in patients with atopic dermatitis, this would not only provide scientific evidence for the above hypothesis, but furthermore this controlled deterioration of the skin condition could serve in the future as a model for testing the safety and efficacy of novel medications to treat atopic dermatitis.



CONTACT

Dr. Philipp Badorrek
Phone +49 511 5350-681
philipp.badorrek@item.fraunhofer.de

Business Unit 2

PROJECT OVERVIEW

Safety and efficacy testing of a herbal product in patients with allergic rhinitis using the Fraunhofer Environmental Challenge Chamber

Safety and efficacy testing of inhaled bronchodilators in patients with chronic obstructive pulmonary disease

Safety and efficacy testing of a chemokine antagonist in patients with chronic obstructive pulmonary disease using endobronchial endotoxin challenge

Characterization of exhaled particles in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease

Bronchoscopic sampling of airway inflammatory cells in patients with asthma

Monitoring of pulmonary inflammation after segmental allergen challenge by using magnetic resonance imaging

Efficacy of an anti-inflammatory compound in patients with asthma

Study on the impact of gravity on the number flux of exhaled endogenous aerosol particles generated in the lung

Further development of a system for aerosolization and controlled administration of lung surfactant by inhalation

Development and validation of a universal method for challenging volunteers by inhalation with environmental and indoor allergens

Study on the effect of grass pollen to induce skin lesions in patients with atopic dermatitis

Study on non-coding RNA as a biomarker in patients with chronic obstructive pulmonary disease

Establishment of low-dose inhalation challenge with endotoxin as a model for drug testing

3





OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CONSUMER PROTECTION

Project Reports

Analytical methods for risk assessment of 3-MCPD esters and glycidyl esters

Development and trial of simple tests to assess the exposure potential and lung toxicity of consumer sprays

Effects of inhaled fine and nano-sized titanium dioxide in the rat lung

Project Overview



A woman with dark hair is looking through the eyepiece of a microscope. The microscope is a large, complex piece of equipment with various lenses and adjustment knobs. The scene is dimly lit, with a blueish tint, suggesting a laboratory environment. The woman's face is in profile, and she appears focused on her work.

OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CONSUMER PROTECTION

The business unit Occupational and Environmental Toxicology and Consumer Protection is engaged in the investigation of chemicals, particles (including nanoparticles), and complex mixtures as they occur at workplaces, in the environment, and in consumer products. Profound knowledge in inhalation toxicology, aerosol process technology, chemical analysis, and toxicological pathology are the hallmarks distinguishing this business unit. The required studies are undertaken at the Fraunhofer ITEM in accordance with national and international guidelines and complying with the principles of Good Laboratory Practice (GLP).

To register a substance, numerous legal regulations controlling the introduction of new products and re-investigation of existing substances need to be taken into account. In many cases, new products and production technologies have to be subjected to evaluation, and indoor air pollution in general has to be assessed. In this context, the development of new techniques for measuring airborne pollutants and their source strengths represents another focus of



research. Physico-chemical and biological models help determine active substances and their release from building materials, furniture, interior decoration, and from consumer products. In addition, the Fraunhofer ITEM develops mathematical simulation models for exposure assessment.

Immunology studies are conducted to investigate sensitizing and immunomodulating effects. Furthermore, potential irritant effects of chemicals and environmental pollutants on the airways are detected by means of different validated in-vitro and, if need be, animal models. A wide scope of in-vitro testing methods is available for use as screening methods and for assessing the genotoxic potential, allowing the number of necessary animal experiments to be reduced. In the Environmental Challenge Chambers of the institute's clinical unit, studies with volunteers are performed to investigate specific aspects of environmental and occupational toxicology.

CONTACTS



Prof. Dr. Clemens Dasenbrock
Phone +49 511 5350-408
clemens.dasenbrock@
item.fraunhofer.de



Prof. Dr. Wolfgang Koch
Phone +49 511 5350-117
wolfgang.koch@item.fraunhofer.de

Project Report

ANALYTICAL METHODS FOR RISK ASSESSMENT OF 3-MCPD ESTERS AND GLYCIDYL ESTERS

SUMMARY

Free and ester-bound 3-monochloropropanediol (3-MCPD) and glycidyl fatty acid esters have long been known to be potentially hazardous contaminants in a variety of foods such as refined vegetable oil. To enable assessment of the risks of these compounds to human health, the Fraunhofer ITEM is conducting two studies in experimental animals on behalf of consumer protection agencies. As a prerequisite for these studies, Fraunhofer ITEM chemists have developed and validated chemical analytical methods that allow both free and bound 3-MCPD to be determined in different biological matrices – in blood, urine, fatty tissue, kidney, liver, and intestine. In addition, they have been able to establish a method for detecting released glycidol.

Over the past few years, there have been more and more reports about fatty acid esters of 3-monochloropropanediol (3-MCPD) and of glycidol being present in foods and refined vegetable oil, in particular in palm oil. To allow exposure of the public to these contaminants to be evaluated, consumer protection agencies need bioavailability data for these substances as a basis for risk assessment. Glycidol, which may be released during metabolism of glycidyl fatty acid esters, is a known genotoxic carcinogen.

The extent to which 3-MCPD and glycidyl fatty acid esters are hydrolysed to 3-MCPD and glycidol in the organism after oral ingestion is being investigated in two animal experimental studies conducted at the Fraunhofer ITEM on behalf of the German Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection (BMELV) with technical consultancy from the German Federal Institute for Risk Assessment (BfR).

At study start, no analytical methods for detection of 3-MCPD or 3-MCPD esters in body fluids (blood, urine), organs (liver, kidney), tissue (fatty tissue), and intestinal contents were known. As a prerequisite for the studies to be conducted, it was therefore necessary to develop highly sensitive and selective methods for the detection of 3-MCPD and 3-MCPD esters in the relevant biological matrices. Furthermore, it was planned to establish a method for detection of the N-terminal valine adduct in hemoglobin (N-(2,3-dihydroxypropyl)valine) as a possible biomarker for glycidol exposure.

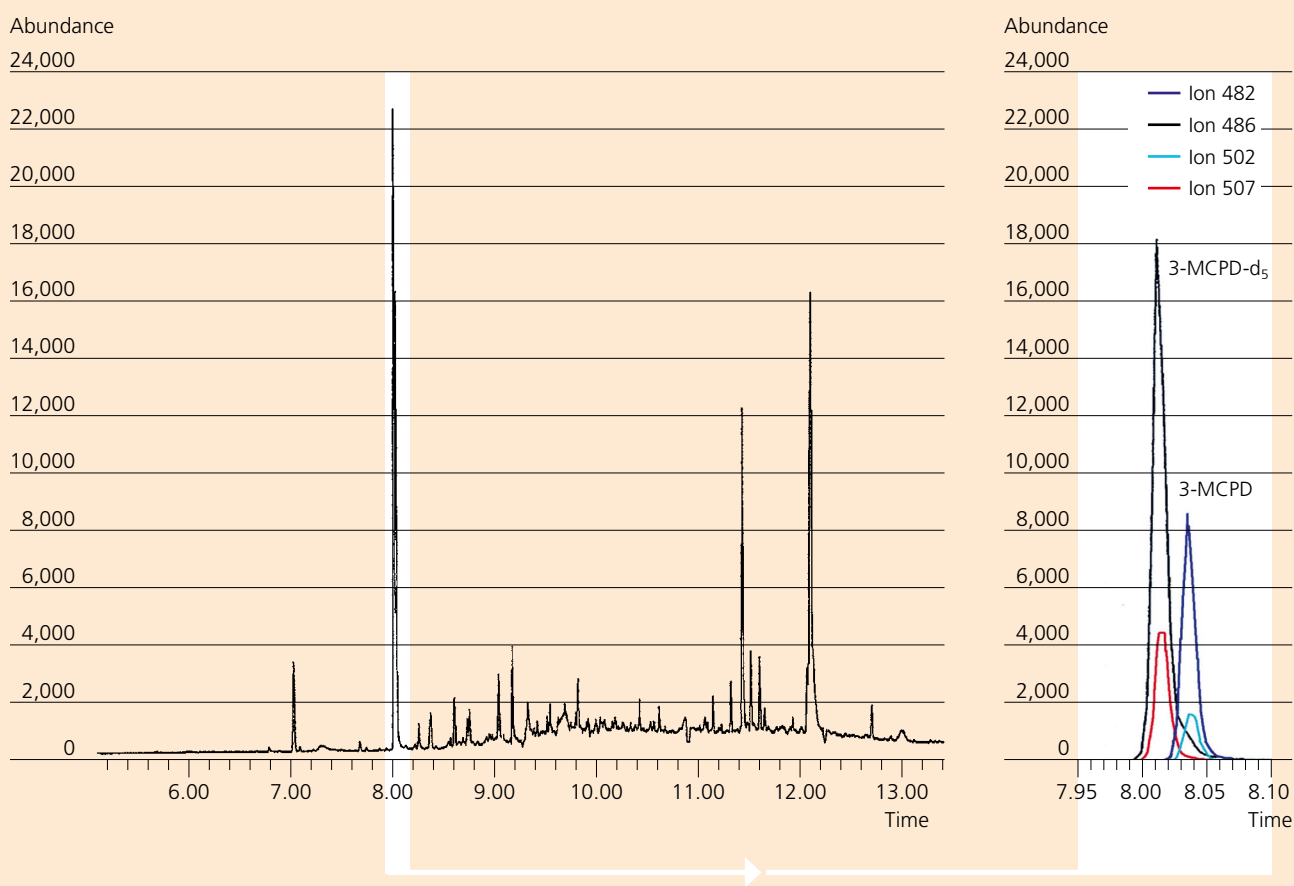


Free 3-MCPD in blood, urine, and organs

After mixing of the samples with silica gel 60, the internal standard (3-MCPD- d_5) was added. Column chromatography was then performed to remove matrix components and concentrate the analyte. After elution with ethyl acetate, 3-MCPD

was derivatized. The GC/NCI-MS method (capillary gas chromatography coupled with mass spectrometry in negative chemical ionization mode) was used to analyze the hepta-fluorobutyric acid derivative of 3-MCPD (Fig. 1). Quantitation was performed by means of an internal calibration in the respective matrix.

Fig. 1: Chromatogram of a rat blood sample after gas chromatography with mass-selective detector in negative chemical ionization mode.



3-MCPD and 3-MCPD esters in organs and intestinal contents

Samples were homogenized and extracted with tertiary methyl butyl ether. Both the extract and the sample residue were shaken with a sodium chloride solution to isolate any free 3-MCPD, which was then derivatized with phenylboronic acid, extracted, and analyzed. Hydrolysis of 3-MCPD ester in the tertiary methyl butyl ether extract was performed with a methanolic sodium methylate solution, and subsequent derivatization of the released 3-MCPD was carried out as described above.

Analysis of the 3-MCPD derivative was done using the GC/EI-MS method. Quantitation was performed through calibration in the corresponding matrix with the internal standards 3-MCPD-d₅ and 1,2-dipalmitoyl-3-chloro-1,2-propanediol-d₅.

N-(2,3-dihydroxypropyl)valine in rat blood

Erythrocytes were isolated from whole blood and lysed, and globin was precipitated. After addition of a synthetic dipeptide anilide as internal standard, the alkylated N-terminal valine was derivatized with pentafluorophenyl isothiocyanate and split off by using a modified Edman procedure. The product was then extracted and derivatized. The GC/NCI-MS method was used for the analysis of the acetylated derivative of N-(2,3-dihydroxypropyl)valine. Quantitation was performed through an internal calibration in pooled rat globin.

Validated analytical methods used successfully

The validated methods are now being used successfully in the ongoing projects. The use of these new methods enables determination of very low concentrations of free 3-MCPD, even in the ng/ml or ng/g range. In animal experiments, a quantity as small as 0.01% of the administered dose can now be detected. With this, it is now possible to get insight into the distribution of the compound in the organism, and this will finally enable risk assessment.



CONTACT

Dr. Edith Berger-Preiß
Phone +49 511 5350-213
edith.berger-preiss@item.fraunhofer.de

Project Report

DEVELOPMENT AND TRIAL OF SIMPLE TESTS TO ASSESS THE EXPOSURE POTENTIAL AND LUNG TOXICITY OF CONSUMER SPRAYS

SUMMARY

The use of sprays, above all of sprays contained in pressurized spray cans, frequently results in adverse, sometimes even severe health effects in consumers. Upon use of waterproofing sprays in particular, severe cases of acute lung injury have been reported repeatedly. Manufacturers of raw materials and bottlers as well as those in charge of consumer protection require application-oriented assessment of the health risk from spray products before these are actually being placed on the market.

Fraunhofer ITEM scientists have developed a holistic strategy for screening of sprays that contain surface-active agents. It consists in an application-oriented assessment of the spray's potential for inhalation exposure and a first assessment of acute lung toxicity in the isolated perfused lung (IPL) of the rat. Using this screening method may help avoid acute animal inhalation studies in the future, in line with the "3-Rs" concept (replace, reduce, refine).

Exposure characterization

To characterize the exposure, the respirable fraction of the aerosol released into the indoor air is measured. For these measurements, the spraying process is simulated in a way that closely mimics the common application process. Exposure-relevant conditions such as droplet aging (volatilization) are thus taken into account as well, allowing the exposure potential of the atomized spray to be assessed. This is in contrast to the hitherto common practice of characterizing only the primary droplet spectrum of the spray generated directly at the spray nozzle.

Testing for acute lung toxicity

For the IPL test, the isolated perfused and controlled ventilated rat lung is exposed to an aged aerosol of the spray formulation according to a standardized nebulization protocol. The inhaled dose is determined, and changes in a variety of monitored respiratory parameters, such as compliance and resistance, as well as edema and atelectasis formation are analyzed (see Fig. 1 for the experimental setup). These endpoints enable assessment of the test item's acute lung toxicity, which is due to an impaired function of the surfactant layer of the lung epithelium as a result of its interaction with the deposited surface-active agent.

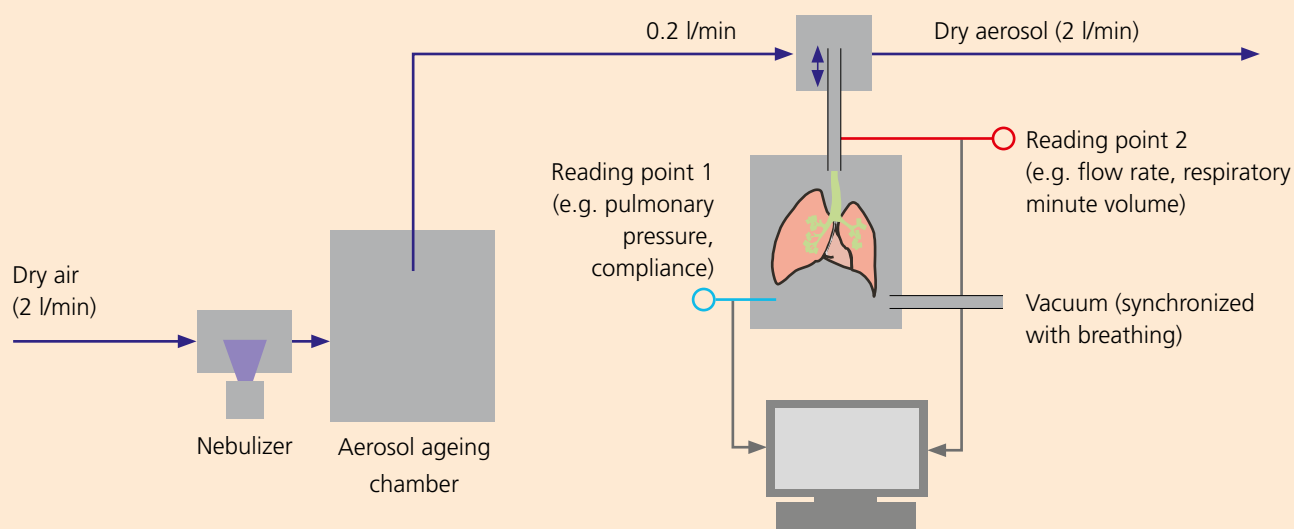
Results

Trials with ten ready-to-use spray products enabled a clear differentiation of exposure potentials depending on the spraying technology used. Worst results were obtained for gas-propelled spray formulations. In relation to the amount of product discharged, they exhibited the largest percentage of respirable particles in the released aerosol. The exposure potential for the use of pump sprays or foaming sprays was smaller by up to two orders of magnitude.

For seven of the investigated substances, analysis of the IPL tests revealed significant changes in the parameters tidal volume, compliance, and resistance as compared to controls.

Macroscopic alterations varied between different substances, ranging from partially collapsed lung areas to complete atelectasis of the entire lung. This was in qualitative agreement with available in-vivo data. With one substance, medium to severe lung edemata were additionally observed in the isolated perfused lung. They had been diagnosed both in the in-vivo experiments performed and in a case series of poisoning among consumers upon use of this substance. The remaining three substances caused no changes in respiratory parameters, and there was also no indication of edema or atelectasis formation as compared to controls. The results of the in-vivo experiments were in the normal range as well. All in all, there was an excellent correlation between the results of the IPL tests and reported in-vivo findings.

Fig. 1: Scientists of the Fraunhofer ITEM use a new strategy to test spray products for acute lung toxicity: they characterize the exposure with an optimized method and test the released aerosol in the isolated perfused rat lung. The figure shows a scheme of the experimental setup.





Conclusion

The two above presented methods – exposure characterization and toxicity testing in the isolated perfused rat lung – can contribute to minimizing the health risk from the use of water-proofing sprays. Firstly, it provides vendors with a reliable tool for optimizing the spraying technology to minimize the exposure potential. Secondly, the results and in particular the comparison of these results with those of the corresponding animal experimental studies have shown that the isolated perfused lung can be used to screen for substances that exhibit acute inhalation toxicity. In the future, tests in the isolated lung could be performed before any testing of a substance in living animals is undertaken, to allow formulations exhibiting acute lung toxicity to be identified and discarded in advance.



CONTACT

Dr. Monika Fischer
Phone +49 511 5350-409
monika.fischer@item.fraunhofer.de

Project Report

EFFECTS OF INHALED FINE AND NANO-SIZED TITANIUM DIOXIDE IN THE RAT LUNG

SUMMARY

An inhalation study in rats has shown that fine and nano-sized TiO_2 particles are very similar in the effects they induce, their translocation behavior, and deposition. Both types of particles cause only slight inflammatory reactions in the lung, and they are deposited predominantly in alveolar macrophages and type-I pneumocytes.

Titanium dioxide (TiO_2) is used as white pigment. It has a low toxic potential and is commonly employed as reference substance in inhalation studies. Particles with a diameter larger than $0.1\ \mu\text{m}$ (100 nm) are generally referred to as fine particles, while smaller particles are called nanoparticles. Due to their small size, the latter may be deposited deep down in the lung upon inhalation, and they can penetrate not only into cells, but also into cell nuclei and organelles. To demonstrate potential differences in the deposition and translocation behavior of fine and nano-sized TiO_2 particles, scientists performed a three-week inhalation study in female rats.

The animals were exposed for six hours daily to TiO_2 of two different sizes (fine and nano), or to clean air as controls. After the exposure, the animals were allowed to recover for 3, 28, or 90 days. The lung tissue was subsequently examined by electron microscopy, histology, and also with stereological methods to quantify particle deposition (relative deposition index, RDI) and the volume fractions of the lung.



Particle agglomerates above all in alveolar macrophages and type-I pneumocytes

Animals that had been treated with fine or nano-sized particles displayed minimal infiltration of inflammatory cells, primarily with alveolar macrophages. Ultrastructurally, a clearly dominant deposition of particle agglomerates of both sizes was observed in the cytoplasm of alveolar macrophages (Fig. 1 A), and to a lesser degree in type-I pneumocytes. This was confirmed to be statistically significant when the RDI was determined for the deposition in alveolar macrophages. The RDI for type-I pneumocytes displayed merely a clear trend, but no statistical significance. This was the first experiment with TiO₂ particles to include direct determination of the RDI.

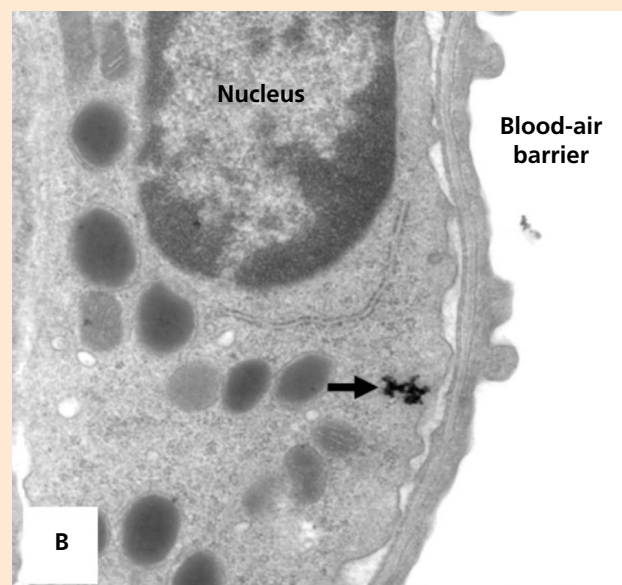
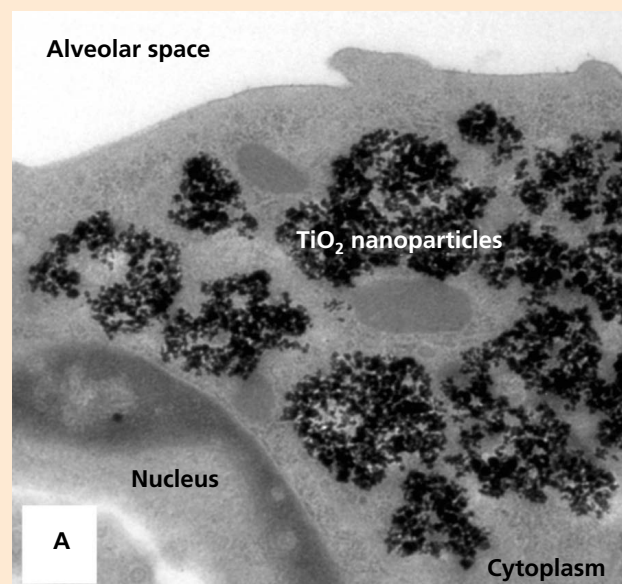
Very few agglomerates of fine and nano-sized particles were also found in bronchial epithelium, the pulmonary interstitium, and capillary endothelium. In a granulocyte detected in a capillary, nanoparticles could be demonstrated in the cytoplasm – a finding which has not been reported previously (Fig. 1 B). Deposited particles were found neither in cell nuclei nor in cell organelles in this study. There were also no structural alterations of cell organelles. No marked differences in effects, particle deposition, and particle translocation were observed between the nano- and fine-particle treatment groups.

Composition of the lung parenchyma, that is, the share of different types of tissue in the total lung volume, was also determined. This analysis showed no substantial prolonged alterations in the treatment groups as compared to controls.

Particle translocation depends on particle agglomeration

Even though the animal species selected for this study was the rat, which has a pro-inflammatory lung milieu and is thus more sensitive to particle-induced lung lesions, the animals exhibited no severe lung injury, no significant differences in the

Fig. 1: TiO₂ nanoparticles in an alveolar macrophage (A) and in the cytoplasm (arrow) of an intracapillary granulocyte (B). The latter finding has not been reported previously in the literature.



translocation behavior of particles, and no subcellular alterations upon inhalation of fine or nano-sized TiO₂ particles. It is true that nanoparticles strongly tend to form agglomerates, resulting in the formation of larger secondary particles. Despite prior ultrasonic treatment, however, the major part of the nanoparticles administered during this experiment had a size above 0.1 µm, which may have caused a reduction of the toxicological potency. Nevertheless, nanoparticles were detected in an intracapillary cell and in the capillary endothelium. Therefore, hematogenous translocation of non-agglomerated nanoparticles to other regions of the body must be considered.

The methods of electron microscopy and stereological analysis used in this study provide detailed insight into the translocation behavior and morphology of fine and nano-sized particles and yield quantitative information about the composition of lung tissue.

The above described investigations were conducted as part of Maja Eydner's doctoral dissertation at the Institute of Pathology of the University of Veterinary Medicine Hannover in cooperation with the Fraunhofer ITEM.



CONTACT

Priv.-Doz. Dr. Susanne Rittinghausen
Phone +49 511 5350-310
susanne.rittinghausen@item.fraunhofer.de

Business Unit 3

PROJECT OVERVIEW

Aerosol Technology

Development of a continuous procedure for the generation of calibration aerosols in the ultrafine particle size range

Characterization of the exposure resulting from the use of spray cosmetics and surface coating sprays

Design and construction of a system for aerosol generation from carbon nanofibers

Development and validation of a method to screen surface-active substances for lung toxicity

Sampling system for diesel oil vapors and aerosols at workplaces

Studies on the solubility of nano-silica

Studies on protective measures for rescue staff during radiological emergencies

Supply of aerosol technological know-how and equipment for setting up and operating an aerosol chamber for microorganisms

Supply of aerosol technological know-how and equipment for exposing dogs to aerosolized active substances

Determination of airborne and respirable particle release during fragmentation of brittle materials

Bio- and Environmental Analytics

Chemical characterization of petroleum products (fuels and lubricants)

Characterization of the composition of biocidal products (substance mixtures)

Studies on formaldehyde release from formaldehyde depot substances

Investigations to determine the inhalation and dermal exposures after application of biocidal products at workplaces and in private homes

Development and validation of analytical methods for biomonitoring of selected metabolites

Determination of 3-MCPD in body fluids and organs

Determination of hemoglobin adducts

Determination of concentrations of pharmaceuticals in exposure atmospheres and formulations

Development of methods for non-target analysis of complex mixtures

Statistical analysis of NMR/MS data for classification of condition-dependent metabolite patterns

Profiling of trace-level and degradation-related impurities in pharmaceuticals by LC-NMR and LC-MS investigations

Collateral analytical investigations in in-vitro exposure studies with gaseous substances

Measurement of specific inorganic tracers for validation of dispersion models

Determination of toxic elements in consumer products

Determination of elements in organs and body fluids in studies investigating the effects of nanoparticles

Clinical Chemistry and ADME

Hematological and
clinico-chemical analyses
in toxicological studies

Investigations on the dermal
uptake of zinc oxide nano-
particles

Investigations on the toxico-
kinetics of radiolabeled
glycidyl palmitate

Investigations on inflamma-
tory parameters and oxidative
stress in rat bronchoalveolar
lavage fluid

Measurement of viability
parameters (LDH, urea) in
cell culture supernatants

Screening investigations in
human cell lines from differ-
ent parts of the respiratory
tract to gain insight into the
toxicity of carbon black
nanoparticles

Databases and Information systems

RITA – Registry of Industrial
Toxicology Animal-data

CEPA – Cell Proliferation
and Apoptosis

goRENI INHAND – Inter-
national Harmonization
of Nomenclature and
Diagnostic criteria

Further scientific develop-
ment of the project DevTox

General and Reproductive Toxicology

Impact of low-frequency
electromagnetic fields on the
developing hematopoietic
system, the immune system,
and the CNS in vivo

Genetic Toxicology

Genotoxicological guideline
studies as part of toxicologi-
cal testing of chemicals

In-vitro and in-vivo investiga-
tions to determine potential
genotoxic effects of electro-
magnetic fields in the radio-
frequency spectrum

Comet assay-based evaluation
of the genotoxic potential
of quartz-containing ceramic
fibers

Mechanistic investigations
concerning the genotoxicity
of nitrostyrene derivatives,
with special focus on topo-
isomerase II activity

Studies on the in-vitro and
in-vivo genotoxicity of inno-
vative pharmaceuticals

Studies on the in-vitro and
in-vivo genotoxicity of SiO₂
nanoparticles

Establishment of cellular
models and optimization of
in-vitro methods to evaluate
the toxic and genotoxic po-
tential of carbon nanotubes

Establishment of the in-vivo
Comet assay in the organs
lung and liver of rats

In Vitro Toxicology

Development of a biological
detector for inhalable test
substances

In-situ analysis of the cellular
effects of airborne pollutants
and active substances in vitro

Extended prevalidation of
the Air/Liquid Interface (ALI)
technology as a testing method
for inhalable substances
(gases) in a round-robin study
with participation of govern-
mental laboratories

Generation of complex cell
culture models for use in air/
liquid interface-based tests

Establishment of an Ames
test for volatile organic
compounds (VOC)

Studies to investigate the
biological effects of inhaled
substances in cells from the
respiratory tract

Inhalation Toxicology

Size separation of fibers into respirable fractions

Studies on the in-vivo solubility of glass fiber dusts

Investigations to assess lung toxicity of toner powders or toner additives

Study into the toxicokinetics of inhaled, poorly soluble nanoscale particles in rats

Dispersion and retention of dusts containing ultrafine primary particles in the lung

Comparative investigation of three nano-titanium dioxides with different surface characteristics in a 28-day inhalation study

Development of screening methods for the detection of a possibly carcinogenic potential of carbon nanotubes

Toxicokinetics study in rats after inhalation exposure to carbon nanotubes

Pathology

Analysis of the translocation of gold nanoparticles to the CNS by electron microscopy

Demonstration of inhaled or instilled nanoparticles in the respiratory tract by electron microscopy

Analysis of the translocation of fine and nanoscale titanium dioxide particles from the nose to the brain by electron microscopy

Impact of low-frequency electromagnetic fields on the developing hematopoietic system, the immune system, and the CNS in the mouse

Genotoxic mechanisms of action of fine and ultrafine dusts in the lung

Histological, immunohistochemical, and morphometric evaluation of the effects of different types of fibers in peritoneal cells

Pathogenetic and immunobiological investigations on the carcinogenicity of particles

Pathology database RITA (Registry of Industrial Toxicology Animal-data) in collaboration with the Working Group on Databases and Information Systems

Determination of cell proliferation in the respiratory tract after inhalation of different types of fibers

Cellular and subcellular effects in rat lung epithelial cells after inhalation of fine and nanoscale titanium dioxide particles

Histological, immunohistochemical, and electron microscopic evaluation of the intraperitoneal effects of carbon nanotubes

4



TESTING AND REGISTRATION OF CHEMICALS, BIOCIDES AND PESTICIDES



Project Reports

Time extrapolation factors in repeated-dose studies

Comparison of methods used to derive limit values for chemicals

Project Overview





TESTING AND REGISTRATION OF CHEMICALS, BIOCIDES AND PESTICIDES

The business unit Testing and Registration of Chemicals, Biocides and Pesticides pools the institute's long-standing experience and comprehensive expertise in risk assessment, covering the fields of toxicology and ecotoxicology as well as assessment of the exposure and behavior in the environment.

Numerous substances for which data are already available require additional evaluations to allow for risk assessment. In addition, the European chemicals policy REACH, which came into force in 2007, requires re-investigation of a large number of active substances that are already on the market. The scientists working in this business unit view and evaluate the existing data and will recommend additional tests for a substance whenever this seems necessary. To close existing data gaps, studies addressing the following endpoints are performed at the Fraunhofer ITEM: toxicokinetics, sensitization, immunotoxicity, subchronic and chronic toxicity, reproductive toxicity, teratogenicity, carcinogenicity, and mutagenicity. Investigations into the mechanisms of action of chemicals can also be conducted.



According to requirements, the Fraunhofer ITEM closely cooperates with different Fraunhofer institutes and other contract research institutions. All data necessary for risk assessments as required by regulations (including physico-chemical properties and ecotoxicity) can thus be provided by a single source, and the overall assessment and registration dossiers can be prepared. All expert reports are created in accordance with high standards.

Legal requirements, in particular the criteria for risk assessments, are subject to constant changes. Through cooperation with national and international committees and authorities as well as participation in round-robin studies, the Fraunhofer ITEM takes part in the development of guidelines and can thus react immediately to changes – a benefit particularly for our clients. It is foreseeable that the demand for risk assessments and additional toxicological studies of chemicals will continue to increase. The assessment of substances falling under REACH is one of the challenges of the years to come. The expertise in this business unit, therefore, will continue to be further expanded.

CONTACTS



Dr. Inge Mangelsdorf
Phone +49 511 5350-303
inge.mangelsdorf@item.fraunhofer.de



Dr. Jochen Buschmann
Phone +49 511 5350-462
jochen.buschmann@item.fraunhofer.de

Project Report

TIME EXTRAPOLATION FACTORS IN REPEATED-DOSE STUDIES

SUMMARY

Chemical risk assessment takes into account the fact that the longer the duration of exposure to a chemical, the lower its adverse effects threshold. If no long-term studies are available, but only short-term animal studies, time extrapolation must be performed. This means that the adverse effects threshold for long-term exposure is determined by applying a factor based on a short-term study. Fraunhofer ITEM scientists have now determined factors by using a broader database than before and, most notably, they have investigated and diminished the impact of differences in the study design. Finally, they have derived factors by taking into account nothing but differences in the development of the adverse effects threshold over time.

In daily life, people inevitably get in contact with a large number of different chemicals, be it as part of their professional activity or at home. Contact with chemical products often takes place repetitively over a prolonged period of time, and yet it should not cause any adverse health effects. Chemical risk assessment has to take into account such chronic exposure. Normally, risk assessment will be based on an animal study that enables derivation of an adverse effects threshold for the chemical, as data on the adverse effects threshold in man are usually not available. The animal data have to be translated to the human situation, that is, they need to be extrapolated. This extrapolation has to take into account not only differences between species (animal/human), but also differences between the duration of the animal experiment and the human exposure duration. According to Haber's rule, the severity of numerous health effects depends on the concentration of the chemical and the exposure duration, that is, the longer the exposure duration, the lower the adverse effects threshold of a chemical. This fact is taken into consideration when performing time extrapolation: the adverse effects threshold for long-term exposure is determined based on a short-term study by applying a factor. For numerous chemicals that have been on the market for a long time and now require re-assessment under REACH, short-term animal studies are available, but no long-term studies. Applying an appropriate factor wherever there is no long-term study available would thus enable risk assessment without further animal experiments.



The factors that can be used for time extrapolation depend on the particular legal context. The diverse regulations rely on different assumptions and analyses. In this project, factors were determined by using a broader database than before and, most notably, the impact of differences in the study design was investigated and diminished.

Computation of factors based on the RepDose database

Fraunhofer ITEM scientists used the Fraunhofer database RepDose (www.fraunhofer-repdose.de) for their calculation of factors. They started by calculating factors for chemicals for which studies with different study durations are available. To this end, they divided the adverse effects threshold of a chemical determined in a short-term study by the equally available adverse effects threshold from a long-term study. The distribution of all these substance-specific factors was then analyzed. The geometric mean or the 90th percentile of such a distribution can be employed as general factor. Similar investigations have been reported, for example, by Kalberlah et al. (2002) and Vermeire et al. (2001). The REACH guidance document, chapter R.8 on the derivation of DNEL values, proposes the following general factors: subacute to subchronic 3, subchronic to chronic 2, and subacute to chronic 6 (REACH Guidance 2010).

Evaluation of time extrapolation factors

Previously published factors were based on small and/or old and heterogeneous data sets. The aim of this project was to evaluate whether and to what extent differences in the design of the studies used to derive factors had an impact on the distribution of these factors and eventually on the derivation of general factors. Furthermore, the Fraunhofer ITEM scientists looked into differences between the factors for different substance groups (industrial chemicals, pesticides, detergents). Oral and inhalation administration were analyzed separately.

Based on the maximum number of pairs of studies available in the RepDose database (up to 236 for the comparison sub-chronic to chronic after oral administration), the influence of several differences in the study design was investigated step by step. The greatest impact on the factors was observed for dose spacing and general comparability of the scope of the studies. Different adverse effects thresholds in two studies with the same chemical may be the result, for example, of differences in the scope of the studies. If the adverse effects threshold in one study was determined by means of a macroscopic change, such as enlargement of an organ, this may have resulted in a higher value than if it had been determined by means of a microscopic examination, for example, on the cellular level. When comparing this study, however, with a study where the adverse effects threshold was determined based on a microscopic change (for example, cellular hypertrophy), the factor will also reflect the difference in the scope of the two studies, but not the substance-specific time course of the adverse effects threshold. The latter could be obtained by analyzing comparable microscopic and macroscopic findings in both studies to determine the adverse effects threshold.

For their final derivation of general factors, the scientists took into consideration only those calculated factors that are very likely to reflect exclusively the development of the adverse effects threshold over time. These general factors are given in Table 1, compared to values that have been published so far for the extrapolation from subchronic to chronic.

Outlook

The factors derived by the Fraunhofer scientists represent an alternative to the factors that have been in use so far. They are the first factors to take into account only differences in the development of the adverse effects threshold over time, but no other differences in the study design. In addition, due to

Table 1: Time extrapolation factors.

The derivation of time extrapolation factors in this project takes into account only those differences that are due to the development of the adverse effects threshold over time and not to differences in study design. Compared to literature data that are based on heterogeneous data sets, these factors (determined as geometric mean of the log-normally distributed data) and also the 90th percentiles are substantially lower. Using these lower factors enables more transparent risk assessment, in particular in case of probabilistic determination of the overall extrapolation factor. As an example, the distribution of factors for subchronic to chronic is given here.

	N	Factor (GM)	90 th percentile
Oral	58	1.4	3.6
Kalberlah, 2002*	68	2.7	20
Vermeire, 2001**	419	2.0	10

* Analysis of inhalation studies which, however, according to the insights gained so far do not yield any different factors than oral studies.

** Meta analysis of 11 published data sets (N = 9-149), very heterogeneous data, comparing, for example, studies in different species (from rat to dog) without any correction to account for interspecies differences.

their low degree of variance the factor distributions described here can be used for a probabilistic determination of the overall extrapolation factor. The factors can help substantiate the derivation of toxicologically justified limit values based on scientific facts and thus achieve a better general acceptance for the defined limit values.

References

- Batke, M.; Escher, S.; Hoffmann-Dörr, S.; Melber, C.; Messinger, H.; Mangelsdorf, I. (2011)
Evaluation of time extrapolation factors based on the database RepDose. *Toxicol. Lett.* 205: 122-129.
- ECHA (2010)
REACH guidance document R.8: Characterisation of dose [concentration]-response for human health. Version 2: December 2010, ECHA-2010-G-19-EN, 185 p.
- Kalberlah, F.; Föst, U.; Schneider, K. (2002)
Time extrapolation and interspecies extrapolation for locally acting substances in case of limited toxicological data. *Ann. Occup. Hyg.* 46, 175-185.
- Vermeire, T.; Pieters, M.; Rennen, M.; Bos, P. (2001)
Probabilistic Assessment Factors for Human Health Risk Assessment – A Practical Guide. TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, The Netherlands, TNO report V3489.



CONTACT

Dr. Monika Batke
Phone +49 511 5350-344
monika.batke@item.fraunhofer.de

COMPARISON OF METHODS USED TO DERIVE LIMIT VALUES FOR CHEMICALS

SUMMARY

On behalf of the German Federal Environment Agency, Fraunhofer scientists have compared methods used to derive toxicologically justified threshold values – that is, limit and guideline values – for chemicals in the environment and in the human body with the method used under REACH to determine such values. They found the methods to be similar in many aspects. To promote acceptance of the values derived under REACH, however, there has to be more transparency regarding the method used for the derivation.

Limit values, reference values, and guideline values are important elements of toxicological risk assessment. A measured or calculated concentration below these values will normally pose no risk to human health. In Germany, such values have been established for quite some time for chemicals that are detectable in soil, water, and the air, and in human urine or blood.

In a research project commissioned by the German Federal Environment Agency (Licht et al., 2011), the methods used to derive such toxicologically justified threshold values were compared with the corresponding method used under the new chemicals regulation REACH (ECHA, 2010). The latter requires the derivation of a concentration below which the substance will have no adverse effects on human health. This threshold value is referred to as Derived No-Effect Level (DNEL).

The comparison of the different methods aimed to identify possibilities for standardization and to bring out what is special about the individual methods.

Comparison of extrapolation factors

Such values are usually derived from the highest tested dose that caused no adverse effects in animal experiments (“...at which there are no statistically significant increases in the frequency or severity of adverse effects between the exposed population and an appropriate control group ...”¹). This dose is referred to as No Observed Adverse Effect Level (NOAEL).

¹ Source: <http://guidance.echa.europa.eu/public-2/glossary.htm> > NOAEL

Factors are then used to translate the NOAEL to the human organism and to a particular human exposure situation. The different methods refer to these factors as extrapolation factors, safety factors, uncertainty factors, or assessment factors.

The factors used to account for interspecies and intraspecies differences are given in Table 1. The exposure duration used in animal experiments is in most cases shorter than the often lifelong (chronic) human exposure. Time extrapolation factors (e.g., subacute to chronic: factor 6) have not been included here. Results from recent research into this topic can be found in the project report on page 152.

The factor applied for interspecies differences accounts for differences between experimental animals and humans, while the factor used for intraspecies differences accounts for differences in sensitivity within the population, that is, variability between individuals.

For interspecies differences, almost all methods use a factor of 10. This factor is composed of the allometry (from rat to man: factor 4) and a factor of 2.5 accounting for miscellaneous other differences. If the derivation is based on a study in mice (allometry from mouse to man: factor 7), this may result in a factor even larger than 10. Other methods do not distinguish explicitly between a toxicokinetic and a toxicodynamic portion, or they merely provide an additional explanation in this regard.

Numerous methods also use a factor of 10 for intraspecies differences as a standard for the general population. If there is any indication of deviant sensitivity (greater or reduced), different factors are permissible in single justified cases. To derive guideline values for indoor air, an additional factor of 2 is normally used to account for the particular sensitivity of children due to their physiology. In the derivation of DNEL values, it is also possible to apply an additional factor for particularly sensitive subgroups, however, its size has not been defined.

If no NOAEL was able to be determined, the lowest dose that caused adverse effects, referred to as Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL), can be used alternatively, in combination with a factor between 1 and 10. An exception is formed by guideline values for indoor air, which are normally based on a LOAEL.

Transparency of the derivation methods

For the general acceptance of the derived values, it is important that the method used for the derivation be transparent and can be readily understood. In most cases, the substance-specific derivation is published in addition to the method used for the derivation. This holds true, for example, for the interpolation method used to derive the risk-related dose or the basic scheme for the derivation of guideline values for indoor air. In many cases, derivations of substance-specific values (such as the WHO drinking water quality targets) are also made public. Such information is published partly in journals or bulletins, partly in the Internet.

According to current knowledge, only the DNEL value is published on the ECHA homepage, but not the derivation method with the factors and NOAEL used. Whether this will have an impact on the general acceptance of the DNEL values can, as yet, not be predicted, because the substances with the registration deadline December 2010 were the first to require derivation of DNEL values on a larger scale.

Conclusion

For all values that have already been derived in Germany, very similar schemes were used. The derivation of DNEL values also follows this scheme without major deviations. Differences are found only with regard to details. Precise instructions about when and to what extent deviations from the standard factors are permissible are in most cases not available. This is most frequently a matter of expert judgment.



To achieve transparency in the derivation of values, it is necessary to lay open to the public the substance-specific derivation. For the DNEL values required under REACH, this has not yet been completely realized. Whether and to what a degree this has an impact on the general acceptance of the newly derived values can, at present, not be predicted.

References

Licht, O.; Voss, J. U.; Mangelsdorf, I. (2011)
Verfahren der gesundheitlichen Stoffbewertung des FB II – ein Methodenvergleich von nationalen und internationalen Bewertungsgrundlagen. Research and development project FKZ 363 01 274, May 2011, on behalf of the German Federal Environment Agency. See also:
www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/4225.pdf
(in German)

WHO (1994)
Assessing Human Health Risks of Chemicals: Derivation of guidance values for health-based exposure limits. Environmental Health Criteria Vol. 170.

ECHA (2010)
REACH guidance document R.8: Characterisation of dose [concentration]-response for human health. Version 2: December 2010, ECHA-2010-G-19-EN, 185 p.



CONTACT

Dr. Oliver Licht
Phone +49 511 5350-334
oliver.licht@item.fraunhofer.de

Table 1: Overview of the extrapolation methods used in different assessment processes (*WHO drinking-water quality guideline values; **WHO air quality guideline values, standard factors not specified, reference to WHO, 1994; # value derived from the LOAEL, with a factor of 3 for a LOAEL from animal experiments; TAD = tolerable absorbed dose; GV = guideline value).

Method	Inter-species	Intra-species	LOAEL/NOAEL	Special features
Industrial chemicals				
DNEL value	4 x 2.5	10	3 (10)	Additional factors, depending on the amount and quality of the data
Soil				
TAD values	1-10	1-10	1-10	TAD values = internal body doses
Drinking water				
WHO quality target*	1-10	1-10	–	Additional factors for the “appropriateness of the study” (1-10) and the “type and severity of the effect” (1-10)
Guideline values of the German Federal Environment Agency	1-10	1-10	1-10	Method similar to the TAD value, external dose, no absorption
Air				
Guideline values for indoor air	10	10	– #	Factor 2 for children; GV I is by a factor of 10 lower than GV II
WHO quality target **	(1-10)	(1-10)	(1-10)	Emphasis on “expert judgment”

Business Unit 4

PROJECT OVERVIEW

Assessment of chemicals

Activities in connection with the European chemicals policy (REACH): consulting for companies, assistance in preparing registration, evaluation of the necessary data, preparation of IUCLID data sets and of chemical safety reports, development of testing strategies, justification for waiving, and exposure scenarios

Preparation and update of IUCLID data sets, SIDS Initial Assessment Profiles, and SIAR Hazard Assessments for industrial chemicals under the HPV initiative of the International Council of Chemical Associations (ICCA); particular experience exists in the work with category approaches

Preparation of International Chemical Safety Cards (ICSC) under the WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS)

Preparation of substance reports for the German "Noxious Agents Information System" (NIS) on behalf of different German *Länder* ministries

Consulting contracts and notification of new substances on behalf of Japanese companies

Preparation of expert reports on the toxicology of different chemicals

Toxicological expert reports and risk assessment of impurities or residues in medicinal products

Biocides

Preparation of dossiers for assessment of existing biocides under the 4th priority list of the European Biocidal Products Guideline, including development of exposure scenarios and testing strategies

Processing of supplementary requests and communication with the registration authorities to include biocidal active substances in Annex I/IA according to guideline 98/8/EC

Development of concepts for product authorization, incl. study monitoring, risk assessments, development of exposure scenarios and testing strategies

QSAR, databases

Data collection and analysis to define categories of hydrocarbon mixtures

Refinement of the TTC values for inhalation exposure on behalf of Cefic

Analysis of organ-specific toxicity in in-vivo studies and correlation with in-vitro test systems on behalf of Cefic

Assessment of substances based on (Q)SAR and read-across

Analysis of extrapolation factors for time, interspecies, and routes, and combination of the distributions on behalf of ERASM

Report on the structure-activity relationships of glycol ether on behalf of the Health and Food Safety Authority of the *Land Bavaria*

Assessment of human and veterinary pharmaceuticals

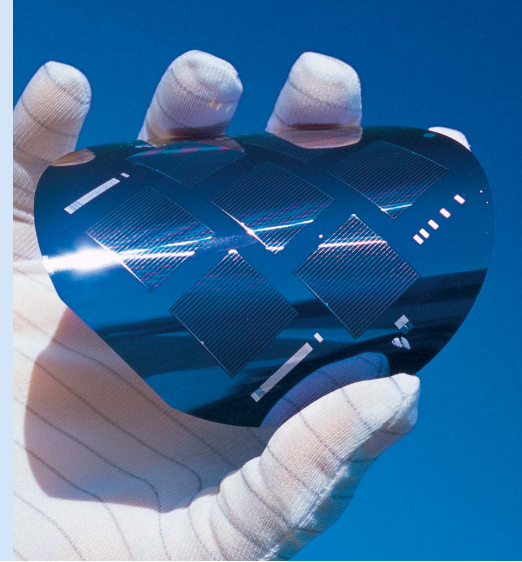
Assessment of the environmental effects of pharmaceuticals

Preparation of expert reports for registration of veterinary drugs

Exposure assessments

Preparation of "Environmental Health Criteria Documents" (EHC) on "Dermal exposure" under the WHO IPCS

FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT



Research of practical utility lies at the heart of all activities pursued by the Fraunhofer-Gesellschaft. Founded in 1949, the research organization undertakes applied research that drives economic development and serves the wider benefit of society. Its services are solicited by customers and contractual partners in industry, the service sector and public administration.

At present, the Fraunhofer-Gesellschaft maintains more than 80 research units in Germany, including 60 Fraunhofer institutes. The majority of the more than 18,000 staff are qualified scientists and engineers, who work with an annual research budget of €1.65 billion. Of this sum, more than €1.40 billion is generated through contract research. More than 70 percent of the Fraunhofer-Gesellschaft's contract research revenue is derived from contracts with industry and from publicly financed research projects. Almost 30 percent is contributed by the German federal and *Länder* governments in the form of base funding, enabling the institutes to work ahead on solutions to problems that will not become acutely relevant to industry and society until five or ten years from now.

Affiliated international research centers and representative offices provide contact with the regions of greatest importance to present and future scientific progress and economic development.

With its clearly defined mission of application-oriented research and its focus on key technologies of relevance to the future, the Fraunhofer-Gesellschaft plays a prominent role in the German and European innovation process. Applied research has a knock-on effect that extends beyond the direct benefits perceived by the customer: Through their research and development work, the Fraunhofer institutes help to reinforce the competitive strength of the economy in their local region, and throughout Germany and Europe. They do so by promoting innovation, strengthening the technological base,

improving the acceptance of new technologies, and helping to train the urgently needed future generation of scientists and engineers.

As an employer, the Fraunhofer-Gesellschaft offers its staff the opportunity to develop the professional and personal skills that will allow them to take up positions of responsibility within their institute, at universities, in industry and in society. Students who choose to work on projects at the Fraunhofer institutes have excellent prospects of starting and developing a career in industry by virtue of the practical training and experience they have acquired.

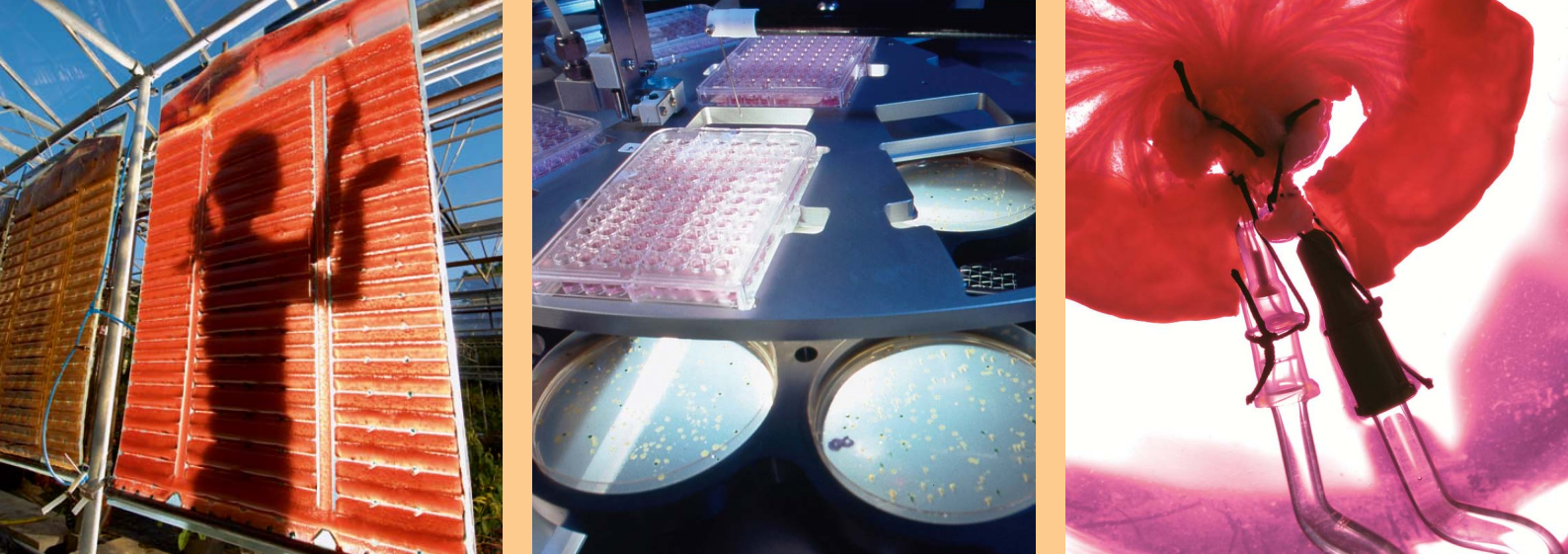
The Fraunhofer-Gesellschaft is a recognized non-profit organization that takes its name from Joseph von Fraunhofer (1787–1826), the illustrious Munich researcher, inventor and entrepreneur.

CONTACT

Fraunhofer-Gesellschaft
Press and Public Relations
Franz Miller
Phone +49 89 1205-1333
Fax +49 89 1205-7515

Hansastraße 27c
80686 München (Germany)

FRAUNHOFER GROUP FOR LIFE SCIENCES



RESEARCH FOR HUMAN HEALTH AND THE ENVIRONMENT

Six Fraunhofer institutes have focused their research on the life sciences. In the Fraunhofer Group for Life Sciences they have pooled their competencies in biology, biomedicine, pharmacology, toxicology, and food technology. With a staff of about 1200, the Fraunhofer Group for Life Sciences is an important R&D partner for the pharmaceutical and biotechnology sectors as well as for the chemicals industry and medical technology companies.

The Fraunhofer Institutes for Biomedical Engineering IBMT, Interfacial Engineering and Biotechnology IGB, Molecular Biology and Applied Ecology IME, Toxicology and Experimental Medicine ITEM, Cell Therapy and Immunology IZI, and Process Engineering and Packaging IVV combine their concentrated expertise to allow for even comprehensive projects to be undertaken for their clients. Research and development in the Fraunhofer Group for Life Sciences cover on the one hand the preventive areas of environmental and consumer protection, and on the other hand the regenerative areas of medical therapy and ecological recovery. The broad range of methods and equipment available within the Fraunhofer Group for Life Sciences is unrivaled at so high a concentration.

What characterizes the research performed in the Fraunhofer Group for Life Sciences is its closeness to industrial application, aiming to develop solutions that meet clients' actual requirements. In addition, the institutes also undertake basic research

to develop the basis for future applications in industry. The business units of the Fraunhofer Group for Life Sciences include translational medicine research and biomedical technology, regenerative medicine, healthy foodstuffs, industrial biotechnology, and research aimed at the safety of processes, chemicals, and pesticides. The Group shows ways of preserving health and the environment in an industrialized world and develops new options for diagnosing and treating diseases in a setting of a more personalized healthcare and for remediating the environment.



CONTACTS

Fraunhofer Group for Life Sciences
Prof. Dr. Dr. Uwe Heinrich
(Group Chairman)



Central Office at the Fraunhofer ITEM
Dr. Claus-Dieter Kroggel
(Head of the Central Office)
Phone +49 511 5350-103
Fax +49 511 5350-155
claus.kroggel@vls.fraunhofer.de

NAMEN, DATEN, EREIGNISSE

NAMES, DATES, EVENTS

PUBLIKATIONEN

PUBLICATIONS

Albrecht, M.; Chen, H.-C.; Preston-Hurlburt, P.; Ranney, P.; Hoymann, H.-G.; Maxeiner, J.; Staudt, V.; Taube, C.; Bottomly, H. K.; Dittrich, A.-M. (2011)
T(H)17 cells mediate pulmonary collateral priming.
In: The Journal of Allergy and Clinical Immunology: JACI 128 (1): 168-177.e8
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.067>)

Andersen, G.; Burkon, A.; Sulzmaier, F. J.; Walker, J. M.; Leckband, G.; Fuhst, R.; Erbersdobler, H. F.; Somoza, V. (2011)
High dose of dietary resveratrol enhances insulin sensitivity in healthy rats but does not lead to metabolite concentrations effective for SIRT1 expression.
In: Molecular Nutrition and Food Research 55 (8): 1197-1206
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201100292>)

Atochina-Vasserman, E. N.; Winkler, C.; Abramova, H.; Schaumann, F.; Krug, N.; Gow, A. J.; Beers, M. F.; Hohlfeld, J. M. (2011)
Segmental allergen challenge alters multimeric structure and function of surfactant protein D in humans.
In: American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 183 (7): 856-864
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201004-0654OC>)

Badorrek, P.; Dick, M.; Hecker, H.; Schaumann, F.; Hohlfeld, J. M.; Krug, N.; Sousa, A. R.; Murdoch, R. (2011)
Anti-allergic drug testing in an environmental challenge chamber is suitable both in and out of the relevant pollen season.
In: Annals of Allergy, Asthma & Immunology 106 (4): 336-341
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anai.2010.12.018>)

Batke, M.; Escher, S.; Hoffmann-Doerr, S.; Melber, C.; Messinger, H.; Mangelsdorf, I. (2011)
Evaluation of time extrapolation factors based on the database RepDose.
In: Toxicology Letters 205 (2): 122-129
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.05.1030>)

Berlinger, B.; Benker, N.; Weinbruch, S.; L'Vov, B.; Ebert, M.; Koch, W.; Ellingsen, D. G.; Thomassen, Y. (2011)
Physicochemical characterisation of different welding aerosols.
In: Analytical and Bioanalytical Chemistry 399 (5): 1773-1780
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-4185-7>)

Billr, H.; Holz, O.; Windt, H.; Koch, W.; Müller, M.; Jörres, R. A.; Krug, N.; Hohlfeld, J. M. (2011)
Breath profiles by electronic nose correlate with systemic markers but not ozone response.
In: Respiratory Medicine 105 (9): 1352-1363
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2011.03.002>)

Bohle, K.; Ross, A. (2011)
Plasmid DNA production for pharmaceutical use: Role of specific growth rate and impact on process design.
In: Biotechnology & Bioengineering 108 (9): 2099-2106
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/bit.23138>)

Bühling, F.; Kouadio, M.; Chwieralski, C. E.; Kern, U.; Hohlfeld, J. M.; Klemm, N.; Friedrichs, N.; Roth, W.; Deussing, J. M.; Peters, C.; Reinheckel, T. (2011)
Gene targeting of the cysteine peptidase cathepsin H impairs lung surfactant in mice.
In: PLoS One 6 (10): Art. e26247
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/Journal.pone.0026247>)

Dasenbrock, C.; Buschmann, J. (2011)
Animal Studies.
In: Cancer Risk Assessment: Methods and Prospective Approaches. Obe, G.; Marchant, G.; Jandrig, B.; Schütz, H. and Wiedemann, P. M. (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 105-124

David, F.; Steinwand, M.; Hust, M.; Bohle, K.; Ross, A.; Dübel, S.; Franco-Lara, E. (2011)
Antibody production in bacillus megaterium: Strategies and physiological implications of scaling from microtiter plates to industrial bioreactors.
In: Biotechnology Journal 6 (12): 1516-1531
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/biot.201000417>)

Dinh, Q. T.; Suhling, H.; Fischer, A.; Braun, A.; Welte, T. (2011)
Neuronale Kontrolle bei chronisch entzündlichen und obstruktiven Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale und COPD.
In: Pneumologie 65 (5): 283-292
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1256123>)

Düchs, M. J.; Hahn, C.; Benediktus, E.; Werner-Klein, M.; Braun, A.; Hoymann, H. G.; Gantner, F.; Erb, K. J. (2011)
TLR agonist mediated suppression of allergic responses is associated with increased innate inflammation in the airways.
In: Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 24 (2): 203-214
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2010.12.009>)

Gerhauser, I.; Wohlsein, P.; Ernst, H.; Germann, P.-G.; Baumgärtner, W. (2011)
Lack of detectable diffuse or neuritic plaques and neurofibrillary tangles in the brains of aged hamsters.
In: Neurobiology of Aging, 4 p. [Jul 8; Epub ahead of print]
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.05.012>)

Hansmann, F.; Herder, V.; Ernst, H.; Baumgärtner, W. (2011)
Spinal Epidermoid Cyst in a SJL Mouse: Case Report and Literature Review.

In: *Journal of Comparative Pathology* 145 (4): 373-377
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.03.002>)

Knothe, S.; Mutschler, V.; Rochlitz, S.; Winkler, C.; Ebensen, T.; Guzman, C. A.; Hohlfeld, J.; Braun, A.; Müller, M. (2011)
Local treatment with BPPcysMPEG reduces allergic airway inflammation in sensitized mice.

In: *Immunobiology* 216 (1-2): 110-117
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.003>)

Knothe, S.; Mutschler, V.; Rochlitz, S.; Winkler, C.; Ebensen, T.; Guzman, C. A.; Hohlfeld, J.; Braun, A.; Müller, M. (2011)
The NKT cell ligand alpha-galactosylceramide suppresses allergic airway inflammation by induction of a Th1 response.

In: *Vaccine* 29 (25): 4249-4255
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.068>)

Koczulla, A. R.; Hattesohl, A.; Biller, H.; Hofbauer, J.; Hohlfeld, J.; Oeser, C.; Gessner, C.; Vogelmeier, C.; Baumbach, J. I.; Wirtz, H.; Jörres, R. A. (2011)
Krankheiten riechen? Eine kurze Übersicht über elektronische Nasen.

In: *Pneumologie* 65 (7): 401-405
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1256252>)

Koczulla, A. R.; Hattesohl, A.; Biller, H.; Hofbauer, J.; Hohlfeld, J.; Oeser, C.; Wirtz, H.; Jörres, R. A. (2011)
Vergleich von vier baugleichen elektronischen Nasen und drei Messaufbauten.

In: *Pneumologie* 65 (8): 465-470
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1256280>)

Kolling, A.; Ernst, H.; Rittinghausen, S.; Heinrich, U. (2011)
Relationship of pulmonary toxicity and carcinogenicity of fine and ultrafine granular dusts in a rat bioassay.

In: *Inhalation Toxicology* 23 (9): 544-554
(DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/08958378.2011.594458>)

Könnecker, G.; Regelman, J.; Belanger, S.; Gamon, K.; Sedlak, R. (2011)
Environmental properties and aquatic hazard assessment of anionic surfactants: Physico-chemical, environmental fate and ecotoxicity properties.

In: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 (6): 1445-1460
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.015>)

Krasteva, G.; Canning, B. J.; Hartmann, P.; Veres, T. Z.; Papadakis, T.; Mühlfeld, C.; Schliecker, K.; Tallini, Y. N.; Braun, A.; Hackstein, H.; Baal, N.; Weihe, E.; Schütz, B.; Kotlikoff, M.; Ibanez-Tallon, I.; Kummer, W. (2011)
Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing.

In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (23): 9478-9483
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1019418108>)

Lauenstein, H. D.; Quarcoo, D.; Plappert, L.; Schleh, C.; Nassimi, M.; Pilzner, C.; Rochlitz, S.; Brabet, P.; Welte, T.; Hoymann, H. G.; Krug, N.; Müller, M.; Lerner, E. A.; Braun, A.; Groneberg, D. A. (2011)
Pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor 1 mediates anti-inflammatory effects in allergic airway inflammation in mice.

In: *Clinical & Experimental Allergy* 41 (4): 592-601
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03636.x>)

Marquardt, A.; Halle, S.; Seckert, C. K.; Lemmermann, N. A. W.; Veres, T. Z.; Braun, A.; Maus, U. A.; Förster, R.; Reddehase, M. J.; Messerle, M.; Busche, A. (2011)
Single cell detection of latent cytomegalovirus reactivation in host tissue.

In: *Journal of General Virology* 92 (6): 1279-1291
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.029827-0>)

Nakanishi, M.; Sato, T.; Li, Y.; Nelson, A. J.; Farid, M.; Michalski, J.; Kanaji, N.; Wang, X.; Basma, H.; Patil, A.; Goraya, J.; Liu, X.; Togo, S.; Toews, M. L.; Holz, O.; Müller, K.-C.; Magnussen, H.; Rennard, S. I. (2011)
PGE₂ stimulates VEGF production through the EP₂ receptor in cultured human lung fibroblasts.

In: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36 p. [Sept 15; Epub ahead of print]
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2010-0115OC>)

Nicholson, G. C.; Kariyawasam, H. H.; Tan, A. J.; Hohlfeld, J. M.; Quinn, D.; Walker, C.; Rodman, D.; Westwick, J.; Jurcevic, S.; Kon, O. M.; Barnes, P. J.; Krug, N.; Hansel, T. T. (2011)
The effects of an anti-IL-13 mAb on cytokine levels and nasal symptoms following nasal allergen challenge.

In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128 (4): 800-807.e9
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.05.013>)

Niehof, M.; Borlak, J. (2011)
HNF4alpha dysfunction as a molecular rationale for cyclosporine induced hypertension.

In: *PLoS One* 6 (1): Art. e16319, 9 p.
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016319>)

Nolte, T.; Rittinghausen, S.; Kellner, R.; Karbe, E.; Kittel, B.; Rinke, M.; Deschl, U. (2011)
RITA - Registry of Industrial Toxicology Animal data: The application of historical control data for Leydig cell tumors in rats.

In: *Experimental and Toxicologic Pathology* 63 (7-8): 645-656
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2010.05.006>)

- Parker, C. M.; Schreiner, C. A.; Hallmark, N.; Kriech, A. J.; Osborn, L. V.; Fuhst, R.; Buschmann, J.; Ernst, H.; Hansen, T.; Pohlmann, G.; Preiß, A.; Ziemann, C. (2011)
 Evaluation of reproductive/developmental and repeated dose (subchronic) toxicity and cytogenetic effects in rats of a roofing asphalt fume condensate by nose-only inhalation.
 In: *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 59 (3): 445-453
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.01.010>)
- Preiss, A.; Berger-Preiss, E.; Elend, M.; Reineke, A.-K.; Hollender, J. (2011)
 Unusual polar metabolites in the groundwater of a contaminated waste site indicate a new pathway of mononitrotoluene transformation.
 In: *Chemosphere* 84 (11): 1650-1657
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.020>)
- Puls, F.; Agne, C.; Klein, F.; Koch, M.; Rifai, K.; Manns, M. P.; Borlak, J.; Kreipe, H. H. (2011)
 Pathology of flupirtine-induced liver injury: A histological and clinical study of six cases.
 In: *Virchows Archiv* 458 (6): 709-716
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-011-1087-9>)
- Repacholi, M.; Buschmann, J.; Pioli, C.; Sypniewska, R. (2011)
 An international project to confirm soviet-era results on immunological and teratological effects of RF field exposure in Wistar rats and comments on Grigoriev et al. [2010].
 In: *Bioelectromagnetics* 32 (4): 325-330
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/bem.20638>)
- Ritorto, M. S.; Borlak, J. (2011)
 Combined serum and tissue proteomic study applied to a c-Myc transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma identified novel disease regulated proteins suitable for diagnosis and therapeutic intervention strategies.
 In: *Journal of Proteome Research* 10 (7): 3012-3030
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/pr101207t>)
- Rochlitzer, S.; Veres, T. Z.; Kühne, K.; Prenzler, F.; Pilzner, C.; Knothe, S.; Winkler, C.; Lauenstein, H.-D.; Willart, M.; Hammad, H.; Müller, M.; Krug, N.; Lambrecht, B. N.; Braun, A. (2011)
 The neuropeptide calcitonin gene-related peptide affects allergic airway inflammation by modulating dendritic cell function.
 In: *Clinical & Experimental Allergy* 41 (11): 1609-1621
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03822.x>)
- Rodt, T.; Luepke, M.; Boehm, C.; Falck, C. von; Stamm, G.; Borlak, J.; Seifert, H.; Galanski, M. (2011)
 Phantom and cadaver measurements of dose and dose distribution in micro-CT of the chest in mice.
 In: *Acta Radiologica* 52 (1): 75-80
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1258/ar.2010.100059>)
- Seehase, S.; Schlepütz, M.; Switalla, S.; Mätz-Rensing, K.; Kaup, F. J.; Zöller, M.; Schlumbohm, C.; Fuchs, E.; Lauenstein, H.-D.; Winkler, C.; Kuehl, A. R.; Uhlig, S.; Braun, A.; Sewald, K.; Martin, C. (2011)
 Bronchoconstriction in nonhuman primates: A species comparison.
 In: *Journal of Applied Physiology* 111 (3): 791-798
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/japplphysiol.00162.2011>)
- Sörgel, M.; Regelin, E.; Bozem, H.; Diesch, J.-M.; Drewnick, F.; Fischer, H.; Harder, H.; Held, A.; Hosaynali-Beygi, Z.; Martinez, M.; Zetzsch, C. (2011)
 Quantification of the unknown HONO daytime source and its relation to NO₂.
 In: *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions* 11 (5): 15119-15155
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.5194/acpd-11-15119-2011>)
- Sörgel, M.; Trebs, I.; Serafimovich, A.; Moravek, A.; Held, A.; Zetzsch, C. (2011)
 Simultaneous HONO measurements in and above a forest canopy: Influence of turbulent exchange on mixing ratio differences.
 In: *Atmospheric Chemistry and Physics* 11 (2): 841-855
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.5194/acp-11-841-2011>)
- Stegmaier, P.; Voss, N.; Meier, T.; Kel, A.; Wingender, E.; Borlak, J. (2011)
 Advanced computational biology methods identify molecular switches for malignancy in an EGF mouse model of liver cancer.
 In: *PLoS One* 6 (3): Art. e17738, 26 p.
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017738>)
- Tank, J.; Biller, H.; Heusser, K.; Holz, O.; Diedrich, A.; Framke, T.; Koch, A.; Grosshennig, A.; Koch, W.; Krug, N.; Jordan, J.; Hohlfeld, J. M. (2011)
 Effect of acute ozone induced airway inflammation on human sympathetic nerve traffic: A randomized, placebo controlled, crossover study.
 In: *PLoS One* 6 (4): Art. e18737, 7 p.
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018737>)
- Gluczkiewicz, I.; Buist, H. E.; Martin, M. T.; Mangelsdorf, I.; Escher, S. E. (2011)
 Improvement of the Cramer classification for oral exposure using the database TTC RepDose – A strategy description.
 In: *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 61 (3): 340-350
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.09.005>)
- Tosiek, M. J.; Gruber, A. D.; Bader, S. R.; Mauel, S.; Hoymann, H.-G.; Prettin, S.; Tschernig, T.; Buer, J.; Gereke, M.; Bruder, D. (2011)
 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells are dispensable for controlling CD8⁺ T cell-mediated lung inflammation.
 In: *The Journal of Immunology* 186 (11): 6106-6118
 (DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1000632>)

Vandebriel, R.; Cransveld, C. C.; Crommelin, D.; Diamant, Z.; Glazenburg, B.; Joos, G.; Kuper, F.; Natsch, A.; Nijkamp, F.; Noteborn, H.; Pieters, R.; Roberts, D.; Roggen, E.; Rorije, E.; Seed, M.; Sewald, K.; Heuvel, R. van den; Engelen, J. van; Verstraelen, S.; Loveren, H. van (2011) Respiratory sensitization: Advances in assessing the risk of respiratory inflammation and irritation.
In: Toxicology in Vitro 25 (7): 1251-1258
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.04.027>)

Veres, T. Z.; Voedisch, S.; Spies, E.; Tschernig, T.; Braun, A. (2011) Spatiotemporal and functional behavior of airway dendritic cells visualized by two-photon microscopy.
In: The American Journal of Pathology 179 (2): 603-609
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.04.039>)

Weltmeier, F.; Borlak, J. (2011) A high resolution genome-wide scan of HNF4alpha recognition sites infers a regulatory gene network in colon cancer.
In: PLoS One 6 (7): Art. e21667, 14 p.
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/Journal.pone.0021667>)

Wevers, D.; Metzger, S.; Babweteera, F.; Bieberbach, M.; Boesch, C.; Cameron, K.; Couacy-Hymann, E.; Cranfield, M.; Gray, M.; Harris, L. A.; Head, J.; Jeffery, K.; Knauf, S.; Lankester, F.; Leendertz, S. A. J.; Lonsdorf, E.; Mugisha, L.; Nitsche, A.; Reed, P.; Robbins, M.; Travis, D. A.; Zommers, Z.; Leendertz, F. H.; Ehlers, B. (2011) Novel adenoviruses in wild primates: A high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions.
In: Journal of Virology 85 (20): 10774-10784
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00810-11>)

Wibbertmann, A.; Mangelsdorf, I.; Gamon, K.; Sedlak, R. (2011) Toxicological properties and risk assessment of the anionic surfactants category: Alkyl sulfates, primary alkane sulfonates, and alpha-olefin sulfonates.
In: Ecotoxicology and Environmental Safety 74 (5): 1089-1106
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.02.007>)

Winkler, C.; Atochina-Vasserman, E. N.; Holz, O.; Beers, M. F.; Erpenbeck, V. J.; Krug, N.; Roepcke, S.; Lauer, G.; Elmlinger, M.; Hohlfeld, J. M. (2011) Comprehensive characterisation of pulmonary and serum surfactant protein D in COPD.
In: Respiratory Research 12: Art. 29, 11 p.
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1465-9921-12-29>)

Zoerner, A. A.; Stichtenoth, D. O.; Engeli, S.; Batkai, S.; Winkler, C.; Schaumann, F.; Janke, J.; Holz, O.; Krug, N.; Tsikas, D.; Jordan, J.; Hohlfeld, J. M. (2011) Allergen challenge increases anandamide in bronchoalveolar fluid of patients with allergic asthma.
In: Clinical Pharmacology and Therapeutics 90 (3): 388-391
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/clpt.2011.94>)

PROMOTIONEN DOCTORATES

Maya Eydner

Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Lunge nach Inhalation von Titandioxid-Nanopartikeln bzw. -Feinpartikeln bei der Ratte.
Tierärztliche Hochschule Hannover
Mai 2011
Histologic and ultrastructural evaluation of rat lungs after inhalation of titanium dioxide nano particles and fine particles, respectively.
University of Veterinary Medicine Hannover
May 2011

Monika Fischer

Testung von Consumer-Sprays in der isoliert perfundierten Lunge der Ratte – eine Alternative zu In-vivo-Untersuchungen?
Tierärztliche Hochschule Hannover
Mai 2011
Testing of consumer sprays in isolated perfused rat lungs – an alternative to in-vivo studies?
University of Veterinary Medicine Hannover
May 2011

Ignazio Garaguso

Entwicklung von MALDI-TOF/Massenspektrometrie-basierten Verfahren zur Erkennung und molekularen Charakterisierung von Proteinen, Phosphoproteinen und DNA-Addukten.
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
März 2011
Development of MALDI-TOF mass spectrometry based methods for the identification and molecular characterization of proteins, phosphoproteins and DNA adducts.
Gottfried Wilhelm Leibniz University Hannover
March 2011

Sandra Krauß

Nitrostyrol-derivate als potentielle neue Zytostatika in der Therapie von Leukämien? Comet-Assay-basierte Untersuchungen zur DNA-schädigenden und pro-apoptotischen Wirkung von β -Nitrostyrol.
Medizinische Hochschule Hannover
Februar 2011
Nitrostyrene derivatives as prospective new cytostatic drugs in the treatment of leukemia? Comet assay-based investigations on the DNA-damaging and pro-apoptotic properties of β -nitrostyrene.
Hannover Medical School
February 2011

Carolin Pilzner

Die funktionelle Rolle lysosomaler Proteasen bei der allergischen Atemwegsentszündung.
Medizinische Hochschule Hannover
Juni 2011
Functional role of lysosomal proteases in allergic airway inflammation.
Hannover Medical School
June 2011

Maria Stella Ritorto

Proteomkartierung von Serum- und Lebergewebeproben von c-Myc-transgenen Mäusen zur Entdeckung von Biomarkerkandidaten des hepatozellulären Karzinoms (HCC).
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Januar 2011
Cancer proteomics of mouse serum and liver tissue samples to discover candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma (HCC) in c-Myc transgenic mice.
Gottfried Wilhelm Leibniz University Hannover
January 2011

Simone Switalla

Charakterisierung der lokalen Atemwegsreizung und -entzündung in PCLS nach akuter Exposition gegenüber biologischen und chemischen Substanzen.
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Januar 2011
Characterization of local respiratory irritation and inflammation after acute exposure to biological and chemical substances in PCLS.
Gottfried Wilhelm Leibniz University Hannover
January 2011

Ann-Carina Wedekind

Einfluss von Surfactant-Protein D auf die Allergenaufnahme und -präsentation dendritischer Zellen und Makrophagen der Lunge.
Medizinische Hochschule Hannover
November 2011
Influence of surfactant protein D on allergen uptake and presentation by dendritic cells and macrophages in the lung.
Hannover Medical School
November 2011

BACHELORARBEITEN

BACHELOR'S THESES

Florian Apitius

Mechanistische Untersuchungen zum toxischen und gentoxischen Potential von trans- β -Nitrostyrol. Topoisomerase II als potentiell Zielenzym?

Hochschule Emden-Leer

März 2011

Mechanistic investigations on the toxic and genotoxic potential of trans- β -nitrostyrene. Is topoisomerase II a potential target enzyme?

University of Applied Sciences Emden-Leer

March 2011

Nancy Böwing

Anforderungen an ein computergestütztes System zur Verwaltung von Medizinprodukten: Ein Pilotprojekt für das Fraunhofer ITEM.

Fachhochschule Hannover

April 2011

Requirements to be met by a computerized system for the administration of medical devices: a pilot project for the Fraunhofer ITEM.

University of Applied Sciences Hannover

April 2011

Carsten Lange

Untersuchungen zum biologischen Effekt inhalierbarer Aerosole in vitro.

Hochschule Emden-Leer

März 2011

Investigations into the biological effects of inhalable aerosols in vitro.

University of Applied Sciences Emden-Leer

March 2011

Melanie Neß

Produktion, Aufreinigung und Validierung eines monoklonalen anti-EpCAM-Antikörpers.

Hochschule Emden-Leer

Februar 2011

Manufacture, purification, and validation of a monoclonal anti-EpCAM antibody.

University of Applied Sciences Emden-Leer

February 2011

Silke Seyock

Biologische Effekte von vielwandigen Kohlenstoffnanoröhren in kultivierten A549-Zellen im Vergleich zu Amosit-Asbest und Baytubes®.

Hochschule Bonn-Rhein-Sieg

August 2011

Biological effects of multi-walled carbon nanotubes in cultured A549 cells in comparison with amosite asbestos and Baytubes®.

University of Applied Sciences Bonn-Rhein-Sieg

August 2011

GELADENE VORTRÄGE AUF TAGUNGEN **INVITED LECTURES AT CONFERENCES**

Elisabeth Apel

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und Metabolisierung von Glycidyl-Estern. Bundesinstitut für Risikobewertung; Projektseminar. Berlin (Germany)
November 2, 2011

Elisabeth Apel, Dr. Edith Berger-Preiß, Dr. Otto Creutzenberg

Analytics in biological samples. ILSI Europe Workshop on 3-MCPD and Glycidyl Esters in Food Products. Brussels (Belgium)
November 9-10, 2011

Dr. Edith Berger-Preiß

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und Metabolisierung von 3-MCPD-Estern. Bundesinstitut für Risikobewertung; Projektseminar. Berlin (Germany)
November 2, 2011

Dr. Jochen Buschmann

An introduction into problems occurring during integration of maternal-fetal findings into new terminology/classification. 7th Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology. Berlin (Germany)
May 4-6, 2011

Dr. Otto Creutzenberg

N1: Results and evaluation of studies performed with ZnO and amorphous SiO₂ nanoparticles. 13th Annual Cefic-LRI Workshop. Brussels (Belgium)
November 16-17, 2011

Prof. Dr. Clemens Dasenbrock

Biological effects, basic mechanisms, interaction mechanisms:
1. Extremely low frequencies. 2011 International Scientific conference on EMF and Health. Brussels (Belgium)
November 16-17, 2011

Dr. Heinrich Ernst

Odontogenic tumours and dental dysplasias in laboratory rodents. BSTP Pathology Module: Digestive System. University of Cambridge. Cambridge (UK)
April 1, 2011

Dr. Ilona Fleischhauer

Qualitätssicherung: Audits bei klinischen Studien. Beitrag im KS-MHH-Fortbildungskurs "Qualifikation zum Prüfarzt/Prüfärztin bzw. Assistenz in klinischen Studien (Grundkurs)". Hannover (Germany)
March 23 and November 11, 2011

Dr. Tanja Hansen

Toxikokinetik von Glycidylpalmitat in der Ratte. Projektseminar, Bundesinstitut für Risikobewertung. Berlin (Germany)
November 2, 2011

Prof. Dr. Dr. Uwe Heinrich

Nanotechnology – Challenges and solutions via inhalation toxicology. 39th MEDICHEM Congress. Heidelberg (Germany)
June 4, 2011

Wen will die außeruniversitäre Medizinforschung als Partner? Rektor oder Dekan? VII. Innovationskongress der deutschen Hochschulmedizin. Berlin (Germany)
July 15, 2011

Prof. Dr. Jens Hohlfeld

Exhaled particles as a biomarker. 10th Workshop "Models of Asthma and COPD". Fraunhofer ITEM. Hannover (Germany)
January 22, 2011

Die Interaktion zwischen allergischer Entzündungsreaktion und pulmonalem Surfactant-System bei Asthma bronchiale. Symposium des SFB 587. Soltau (Germany)
February 25, 2011

Wie können wir pathophysiologische Veränderungen bei COPD frühzeitig sichtbar machen? Müssen wir dazu nur die Lunge oder auch andere Systeme betrachten? 52. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin.

Dresden (Germany)
April 10, 2011

Wirksamkeitsprüfung von Medikamenten im Allergenprovokationsraum. Qualitätszirkel des Allergiezentrum Hessen. Universitätsklinikum Marburg.

Marburg (Germany)
September 14, 2011

Unspezifische Provokationstests. Seminar beim 36. Jahreskongress der Norddeutschen Gesellschaft für Pneumologie.

Hamburg (Germany)
November 4, 2011

Prof. Dr. Wolfgang Koch

Estimation of the consumer inhalation risk of waterproofing aerosols. Modern Principles of Air Monitoring (AIRMON).

Loen (Norway)
June 18-23, 2011

Ultrafine and nanoscaled particles: Properties and physical behavior. Modern Principles of Air Monitoring (AIRMON).

Loen (Norway)
June 18-23, 2011

Prof. Dr. Norbert Krug

Can mechanisms inducing disease modification be differentiated by studying structural endpoints in the lung? Novartis Advisory Board Meeting.

London (UK)
May 9, 2011

Translational research at Fraunhofer ITEM. 9. Niedersächsischer "Life Science"-Tag. International Neuroscience Institute.

Hannover (Germany)
June 23, 2011

Hightech aus der Atemwegsforschung: "Allergen Challenge Chamber", Exhalatanalyse und "Elektronische Nase", GA²LEN Summer School.

Berlin (Germany)
July 1, 2011

Clinical trials in an Environmental Challenge Chamber (ECC). Allergic Rhinitis Forum 2011, Japan Allergy Foundation.

Tokyo (Japan)
August 20, 2011

Airway research at the Fraunhofer ITEM. Biomedical Research Center for Translational Medicine, Fudan University.

Shanghai (China)
August 23, 2011

The concept of the new Clinical Research Center (CRC) Hannover. 5th International VPM Days. TWINCORE Hannover.

Hannover (Germany)
September 2, 2011

Asthma und Rhinitis: die Entzündung im Fokus pathophysiologischer Aspekte. Symposium beim 6. Deutschen Allergiekongress.

Wiesbaden (Germany)
September 9, 2011

Biomarker für COPD – die Bedeutung der ECLIPSE-Kohorte für RIBOLUTION. Ribolution-Kick-off-Meeting. Fraunhofer IZI.

Leipzig (Germany)
September 29, 2011

"Airway Challenge" studies: from mice to men. 3rd Respiration Forum. University Hospital of South Manchester.

Manchester (UK)
November 23, 2011

Dr. Stella Marie Reamon-Büttner

Unraveling epigenetic fingerprints of smell sensitivity and dysfunction to a better quality of life, disease diagnostics, and therapy. Workshop Aromaforschung, Fraunhofer IVV.

Freising (Germany)
May 11-12, 2011

Dissecting epigenetic silencing complexity in mouse lung cancer cells. Seminar, Fraunhofer IGB.

Stuttgart (Germany)
August 11, 2011

Dr. Katherina Sewald

Grundlagen der Immuntoxikologie. Fraunhofer ITEM.

Hannover (Germany)
September 29, 2011

Dr. Christina Ziemann

Wirkungsprinzipien der Genotoxizität von Fein- und Ultrafeinstäuben in der Lunge. Dialog-Forum: Nanomaterialien am Arbeitsplatz, BAuA.

Dortmund (Germany)

January 17, 2011

Discrepancy between high clastogenic activity of trans- β -nitrostyrene in vitro and lack in carcinogenicity might be related to inactivating metabolism and its high reactivity towards thiol groups. 77. Jahrestagung der DGPT.

Frankfurt/Main (Germany)
April 1, 2011

Genetische Toxikologie – Grundlagen und Methoden unter Berücksichtigung strahleninduzierter Schäden. Abteilungsfortbildung der Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie, Universitätsmedizin Göttingen.

Göttingen (Germany)
April 27, 2011

BEITRÄGE ZU TAGUNGEN

CONTRIBUTIONS TO CONFERENCES

Batke, M.; Escher, S. E.; Tluczkiewicz, I.; Aldenberg, T.; Kroese, D. E.; Buist, H. E.; Mangelsdorf, I.
ITS RepDose: A functional integrated testing strategy for the endpoint repeated dose toxicity. EPAA Annual Conference.
Brussels (Belgium)
November 9, 2011

Berger-Preiß, E.; Behnke, W.; Hahn, S.; Kock, H.; Gerling, S.; Schröder, K.; Koch, W.
Validation of an EDP-supported model for assessing inhalation exposure during indoor spraying processes. IndoorAir2011.
Austin, Texas (USA)
June 5-10, 2011

Ernst, H.; Lehmbecker, A.; Baumgärtner, W.; Creutzenberg, O.; Dasenbrock, C.; Eydner, M.; Kolling, A.; Schaudien, D.; Rittinghausen, S.
Laryngeal lesions induced in Wistar WU rats by inhalation of nanoscaled titanium dioxide (TiO₂ P_{2.5}). 9th European Congress of Toxicologic Pathology.
Uppsala (Sweden)
September 7-10, 2011

Fischer, M.; Dasenbrock, C.; Koch, W.
Risk assessment – Testing of consumer sprays with surface-active agents. 30th Annual Meeting of the Association of Inhalation Toxicologists.
Oxford (UK)
October 5-7, 2011

Hohlfeld, J. M.; Schwarz, K.
Exhaled particles as a biomarker. 10th Workshop "Models of Asthma and COPD".
Hannover (Germany)
January 21-22, 2011

Koch, W.; Dunkhorst, W.; Lödding, H.
Langzeiterfahrung mit dem photometrischen On-line-Verfahren zur Messung von PM₁₀ und PM_{2.5} in der Außenluft. Neue Entwicklungen bei der Messung und Beurteilung der Luftqualität, UMTK 2011.
Baden-Baden (Germany)
May 11-12, 2011

Könnecker, G.; Regelman, J.; Grcar, M.
Use of Perboric Acid, Sodium Salt (PBS) – Has REACH improved our state of knowledge on the risk for the aquatic environment? In: Abstract book EMERG P31, 179. International Conference on Chemistry and the Environment (ICCE 2011).
Zurich (Switzerland)
September 11-15, 2011

Kolling, A.; Buschmann, J.; Ernst, H.; Lehmbecker, A.; Rittinghausen, S.; Schaudien, D.; Rusch, G. M.
Unexpected brain lesions in lactating Sprague-Dawley rats in a two-generation inhalation reproductive toxicity study with pentafluoropropane. 9th European Congress of Toxicologic Pathology.
Uppsala (Sweden)
September 7-10, 2011

Lewin, G.; Müller, M.; Braun, A.; Buschmann, J.
Development of immunological characteristics in newborn rats, PND 2-21. 39th Conference of the European Teratology Society.
Gent (Belgium)
September 4-7, 2011

Licht, O.; Wibbertmann, A.
Toxikologische Bewertung von Extractables & Leachables: Wie kann die Sicherheit der Patienten gewährleistet werden? In: VDI-Verlag, Düsseldorf, p. 99-105. 1. VDI-Konferenz Extractables & Leachables 2011: Anforderungen an medizintechnische Produkte und Verpackungen.
Munich (Germany)
July 6-7, 2011

Liebig, M.; Floeter, C.; Hahn, T.; Wenzel, A.
Development of risk mitigation measures within registration and authorisation of human and veterinary pharmaceuticals. SETAC Europe 21st Annual Meeting.
Milan (Italy)
May 15-19, 2011

Mann, P. C.; Vahle, J. L.; Keenan, C. M.; Baker, J. F.; Bradley, A. E.; Goodman, D. G.; Harada, T.; Herbert, R.; Kaufmann, W.; Kellner, R.; Nolte, T.; Rittinghausen, S.; Tanaka, T.
INHAND: international harmonization of nomenclature and diagnostic criteria for lesions in rats and mice – an update. 9th European Congress of Toxicologic Pathology.
Uppsala (Sweden)
September 7-10, 2011

Metcalf, M.; Koch, W. E.; Turner, G.

Break up testing of wasteform materials. Geological disposal of radioactive waste: Underpinning Science and Technology.

Loughborough (UK)

October 18-20, 2011

Ritter, D.; Knebel, J.

Toxicological characterization of inhalable substances and aerosols in vitro: Enhancement of experimental methods by in situ fluorescence analysis of the cellular status during exposure. 47th Congress of the European Societies of Toxicology.

Paris (France)

August 28-31, 2011

Ritter, D.; Knebel, J.

Improvement of experimental methods for toxicological characterization of inhalable substances in vitro by in situ analysis of the cellular status based on fluorescence stainings. In: Archives of Pharmacology, Vol. 383, Suppl. 1, March 2011, 89. 77th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie.

Frankfurt/Main (Germany)

March 30 - April 1, 2011

Rühl-Fehlert, C.; Halm, S.; Rittinghausen, S.; Rinke, M.

Spontaneous incidences of thymomas in rodent carcinogenicity studies. 30th Annual Symposium Society of Toxicologic Pathology, STP.

Denver (USA)

June 19-23, 2011

Schaudien, D.; Lewin, G.; Rittinghausen, S.; Ernst, H.

Hyaline glomerulopathy in a CD-1 mouse. 9th European Congress of Toxicologic Pathology.

Uppsala (Sweden)

September 7-10, 2011

Schwarz, K.; Biller, H.; Koch, W.; Hohlfeld, J. M.

Physical breath aerosol characterization for particle-based pulmonary diagnostics. 18th Congress of the International Society for Aerosols in Medicine.

Rotterdam (The Netherlands)

June 18-22, 2011

Schwarz, K.; Hohlfeld, J. M.; Koch, W.

Single breath particle size characterization – a technique for detection of alterations in small airway physiology? 18th Congress of the International Society for Aerosols in Medicine.

Rotterdam (The Netherlands)

June 18-22, 2011

Schwarz, K.; Hohlfeld, J. M.; Koch, W.

Der Einfluss der Gravitation auf das Partikelgrößenspektrum endogen generierter exhalierter Partikel. Workshop "Gesundheitsforschung im Raumfahrtprogramm" des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt und der Deutschen Sporthochschule Köln.

Cologne (Germany)

September 27-28, 2011

Seehase, S.; Lauenstein, H.-D.; Zöller, M.; Kaup, F.-J.; Schlumbohm, C.; Sewald, K.; Braun, A.; Knauf, S.

Der Weißbüschelaffe als translationales Tiermodell für entzündliche Atemwegserkrankungen des Menschen. Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie der DGP.

Homburg/Saar (Germany)

November 11-12, 2011

Smirnova, L.; Pirow, R.; Liebsch, M.; Tharmann, J.; Luch, A.;

Bauer, M.; Graebisch, C.; Linsel, G.; Siemers, R.; Otto, C.; Tröller, S.; Müller, N.; Berger-Preiß, E.; Kock, H.; Oertel, A.; Ritter, D.; Knebel, J.

Air/liquid interface technique as an alternative in vitro testing strategy for detecting biological effects of volatile compounds. First results and future perspectives of an ongoing prevalidation study (P). In: ALTEX 28, Special Issue, Montreal 2011, 113. 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in Life Sciences.

Montreal (Canada)

August 21-25, 2011

Smirnova, L.; Liebsch, M.; Tharmann, J.; Pirow, R.; Luch, A.; Bauer, M.; Graebisch, C.; Linsel, G.; Siemers, R.; Otto, C.; Berger-Preiß, E.; Kock, H.; Oertel, A.; Ritter, D.; Knebel, J.

Testing of the toxicity of volatile compounds on human lung cells using the air-liquid interface (ALI) culturing and exposure technique: a prevalidation study (P). IVTIP Spring 2011 Meeting in collaboration with ESTIV and CAAT.

Monte Carlo (Monaco)

April 26-28, 2011

Stauber, J.; Hahn, T.; Dobson, S.; Howe, P.; Kielhorn, J.; Koennecker, G.; Diamond, J.; Lee-Steere, C.; Schneider, U.; Sugaya, Y.; Taylor, K.; Van Dam, R.

Sources of variability in environmental hazard assessment of chemicals in aquatic systems: an international analysis. International Conference on Deriving Environmental Quality Standards for the Protection of Aquatic Ecosystems (EQSPA – 2011). University of Hong Kong. December 3-7, 2011

Switalla, S.; Ritter, D.; Knebel, J.; Dasenbrock, D.; Braun, A.; Sewald, K. Cigarette smoke exposed precision-cut lung slices (PCLS) as a new in vitro model for smoke induced toxicity. 50th Anniversary and Annual Meeting of the Society of Toxicology, SOT.

Washington D.C. (USA)

March 6-10, 2011

MITARBEIT IN GREMIEN

ACTIVE PARTICIPATION IN COMMITTEES

Dr. Edith Berger-Preiß

Working group on phthalate measurement "Messen von Phthalaten" of the Association of German Engineers (VDI)

Working group on analyses in biological materials "Analysen in biologischen Materialien" of the German Research Foundation (DFG)

Reviewer for international journals in analytics and biomonitoring

Dr. Annette Bitsch

Commission on food additives, flavorings, and processing aids "Lebensmittelzusatzstoffe, Aromastoffe und Verarbeitungshilfen" of the German Federal Institute for Risk Assessment (BfR)

Expert panel on wood preservatives in timber construction of the German Federal Institute for Construction Technology (DIBt)

Working committee on probabilistic exposure and risk assessment "Probabilistische Expositionsabschätzung"

Prof. Dr. Armin Braun

Reviewer for international journals in respiratory medicine and immunology (incl. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine and Journal of Allergy and Clinical Immunology)

Reviewer for international foundations (incl. The Swedish Foundation for Strategic Research and the Fonds National de la Recherche Luxembourg)

PhD commission of the Hannover Medical School (MHH)

Scientific advisory committee of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI)

Dr. Jochen Buschmann

Working committee on reproductive toxicity "AK Reproduktionstoxizität" of the toxicology advisory board of the German Committee on Hazardous Substances (AGS)

Dr. Otto Creutzenberg

Reviewer for international journals in particle and fiber toxicology (Particle and Fibre Toxicology, Inhalation Toxicology)

Prof. Dr. Clemens Dasenbrock

Committee on Non-Ionizing Radiation, German Radiation Protection Board (SSK)

Editorial board of the journal "Experimental and Toxicologic Pathology"

Treasurer of the German Society for the Promotion of Biomedical Research

IARC Working Group member for Volume 102 of the IARC Monographs on Radiofrequency Electromagnetic Fields

Dr. Ivan Dobrev

Temporary advisor in the WHO International Program on Chemical Safety (IPCS)

International WHO working group for the preparation of International Chemical Safety Cards (ICSC)

Dr. Heinrich Ernst

Editorial board of the journal "Experimental and Toxicologic Pathology"

"Guess What" Committee of the European Society of Toxicologic Pathology (ESTP)

INHAND (International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria) organ working groups "Soft Tissue" and "Skeletal System"

Reviewer for the international journal "Toxicologic Pathology"

Dr. Ilona Fleischhauer

Working groups on GLP quality assurance/control "GLP: Qualitätssicherung/Überwachung", GLP analytics "GLP: Analytik", and GCP quality management "GCP: Qualitätsmanagement" of the German Society for Good Research Practice (DGGF)

Dr. Rainer Fuhst

Invited specialist for Volume 103 of the IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Bitumen and bitumen fumes, and some heterocyclic aromatic hydrocarbons

Dr. Stefan Hahn

Working committee on chemical risk assessment "Chemikalienbewertung" (deputy head) of the division of environmental chemistry and exotoxicology "Umweltchemie und Ökotoxikologie" within the German Chemical Society (GDCh)

Prof. Dr. Dr. Uwe Heinrich

Research Committee of the Health Effects Institute (HEI), Boston, USA

DFG Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area (MAK Commission)

Working group on "Dusts" of the MAK Commission

Ad hoc working group on "Nanoparticles" of the MAK Commission

Ad hoc working group on "Metals" of the MAK Commission

Subcommittee III of the Committee on Hazardous Substances under the German Federal Minister of Labor and Social Affairs

Working group on "Fibers and Dusts" of the Subcommittee III of the Committee on Hazardous Substances under the German Federal Minister of Labor and Social Affairs

Working group on "Metals" (chairman) of the Subcommittee III of the Committee on Hazardous Substances under the German Federal Minister of Labor and Social Affairs

Committee supporting the public authorities responsible for the approval of animal experiments (Animal Protection Commission)

Invited member of the working groups on particles, fibers, diesel engine exhaust, polycyclic aromatic hydrocarbons, metals, irritant gases, and air pollution for the compilation of IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans

WHO working groups on air pollution and IPCS issues

Scientific advisory committee of the German Federal Institute for Drugs and Medical Devices (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM)

Advisory committee of the Institute for Prevention and Occupational Medicine (IPA) of the German Social Accident Insurance (DGUV)

Advisory committee "VDI Area of Competence Biotechnology" of the Association of German Engineers (VDI)

Editorial board of the journal "Umweltmedizin in Forschung und Praxis"

Editorial board of the "International Journal of Hygiene and Environmental Health"

Co-editor of the manual "Gefährdungsabschätzung von Umweltschadstoffen" (hazard assessment of environmental pollutants)

Chairman of the Fraunhofer Group for Life Sciences

Presidential Council of the Fraunhofer-Gesellschaft

Prof. Dr. Jens Hohlfeld

Reviewer for international journals (incl. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, European Respiratory Journal, Journal of Allergy and Clinical Immunology)

External expert for the German Research Foundation (DFG)

Deputy spokesman of the DFG Collaborative Research Center SFB 587 "Immune Reactions of the Lung in Infection and Allergy"

Dr. Heinz-Gerd Hoymann

IMI (Innovative Medicines Initiative), Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcomes (U-BIOPRED), Work package 6

Dr. Rupert Kellner

Councilor for electronic communication and member of the Executive Board of the European Society of Toxicologic Pathology (ESTP)

Global Editorial and Steering Committee (GESC) for the initiative "International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria for Lesions in Rats and Mice" (INHAND)

Prof. Dr. Wolfgang Koch

Editorial board of the "Journal of Aerosol Science"

Lecturer at the Technical University of Clausthal-Zellerfeld on dissemination of pollutants in the atmosphere and on aerosols in the environment

Dr. Gustav Könnecker

Working committee on European chemicals policy "Europäische Chemikalienpolitik" of the state government of the *Land* Lower Saxony ("Energie- und Ressourceneffizienz", 6th governmental commission)

Working committee on soil chemistry and soil ecology "Bodenchemie und Bodenökologie" of the division of environmental chemistry and exotoxicology "Umweltchemie und Ökotoxikologie" within the German Chemical Society (GDCh)

Prof. Dr. Norbert Krug

Reviewer for international journals in respiratory medicine and allergy (incl. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Thorax, European Respiratory Journal, Journal of Allergy and Clinical Immunology, Allergy, and Clinical and Experimental Allergy)

External expert for the German Research Foundation (DFG)

Panel of non-university health research institutions "Ausschuss der nicht-universitären Forschungseinrichtungen in der Gesundheitsforschung" of the German Health Research Council (GFR)

Scientific advisory board of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI)

Dr. Oliver Licht

Working committee on chemical risk assessment "Chemikalienbewertung" of the division of environmental chemistry and exotoxicology "Umweltchemie und Ökotoxikologie" within the German Chemical Society (GDCh)

Working committee on regulatory toxicology "Regulatorische Toxikologie" of the German Society of Toxicology within the German Society of Clinical and Experimental Pharmacology and Toxicology (DGPT)

Member of the public relations committee of the German Society of Toxicology within the German Society of Clinical and Experimental Pharmacology and Toxicology (DGPT)

Lecturer at the RWTH Aachen University on toxicology and risk assessment

Dr. Norbert Lütke

Working group on electronic data processing "EDV" of the German Society for Good Research Practice (DGGF)

Fraunhofer quality management network

Dr. Inge Mangelsdorf

Commission on indoor air hygiene "Innenraumlufthygiene" of the German Federal Environmental Agency

Temporary advisor in the WHO International Program on Chemical Safety (IPCS)

Priv.-Doz. Dr. Susanne Rittinghausen

Editorial board of the journal "Experimental and Toxicologic Pathology"

Co-optive member of the ESTP board: representative for nomenclature and RITA

Global Editorial and Steering Committee (GESC) for the initiative "International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria for Lesions in Rats and Mice" (INHAND)

"Guess What" Committee (chair) of the European Society of Toxicologic Pathology (ESTP)

INHAND (International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria) organ working groups "Respiratory System", "Endocrine System", and "Soft Tissue"

Reviewer for the international journal "Toxicologic Pathology"

Dr. Katrin Schröder

Working committee on probabilistic exposure and risk assessment "Probabilistische Expositions- und Risikoabschätzung"

Commission on exposure assessment and exposure standardization "Expositionsschätzung und -standardisierung" of the German Federal Institute for Risk Assessment (BfR)

Dr. Sven Schuchardt

Associate editor of the journal "Biological Chemistry"

Speaker of the Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM) study group "Bioanalytics"

Reviewer for international journals in biochemistry and analytics (incl. Journal of Proteome Research, Electrophoresis, Proteomics, and Talanta)

Dr. Holger Ziehr

Association of German Engineers (VDI) committee 6305 "Technical Good Manufacturing Practice"

Dr. Christina Ziemann

Working group "Genotoxicity" of the DIN Standardization Committee 119.01.03.07.03

Member of the GUM working group on threshold mechanisms of genotoxins

FORSCHUNGSPROJEKTE RESEARCH PROJECTS

National National

BMBF

Kompetenznetz "Die Virtuelle Leber"

BMBF-Programm "Auswirkungen synthetischer Nanomaterialien auf den Menschen" (NanoCare)

Projekt: CarbonBlack

Prädiktion humantoxikologischer Wirkung synthetischer Carbon-Black-Nanopartikel

Projekt: CarboTox

Entwicklung von Screening-Verfahren zur Untersuchung eines möglichen kanzerogenen Potenzials von Carbon-Nanotubes

BMBF-Programm "Ersatz und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch"

Erweiterte Prävalidierungsstudie zur Prüfung der toxischen Wirkung von inhalativ wirksamen Stoffen (Gasen) nach Direktexposition von Lungenzellen des Menschen an der Luft-/Flüssigkeitsgrenzschicht

BMBF-Programm "Vermeidung von Tierversuchen"

Validierung des Ex-vivo-Modells PCLS zur Prädiktion respirations-toxikologischer Effekte

Bundesamt für Strahlenschutz

Einfluss niederfrequenter elektromagnetischer Felder auf das sich entwickelnde blutbildende System, das Immunsystem und das ZNS in vivo

Ermittlung der Zeitabhängigkeit der Resuspension partikelgebundener radioaktiver Kontaminationen von urbanen Oberflächen unter Berücksichtigung unterschiedlicher Umwelteinflüsse und Gegenmaßnahmen

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA)

Validierung eines DV-gestützten Modells zur Abschätzung der inhalativen und dermalen Exposition bei Sprayprozessen. Forschungsvorhaben F 2137

Gentoxischer Wirkmechanismus von Fein- und Ultrafeinstäuben in der Lunge. Forschungsprojekt F 2135

Dispersion und Retention von Stäuben mit ultrafeinen Primärpartikeln in der Lunge. Forschungsprojekt F 2133

Toxische Wirkungen verschiedener Modifikationen eines Nanopartikels nach Inhalation. Forschungsprojekt 2246

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

Subakute Toxizitätsstudien mit 3-MCPD-Diester bzw. 3-MCPD mit anschließender Proteomik-Analyse

Toxikokinetikstudie zur Charakterisierung der Aufnahme und Verteilung von Silbernanopartikeln in Wistar-Ratten

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit

Entwicklung einer Strategie zur Bildung von Kategorien und Definitionen neuer Kategorien für die Endpunkte subakute, subchronische und chronische Toxizität zur Minimierung von Tierversuchen unter REACH

DFG

From Regenerative Biology to Reconstructive Therapy (REBIRTH). Exzellenzcluster

DFG-Paketantrag "Diagnostik und Verlaufskontrolle von Lungenerkrankungen anhand exhalierter Aerosole"

Diagnostik und Verlaufskontrolle von Lungenerkrankungen anhand exhalierter Aerosole beim Menschen

Graduiertenkolleg 1441 "Regulation der allergischen Antwort in Lunge und Haut"

Prevention of allergic inflammation and asthma by the synthetic TLR2/6 agonist MALP

Bedeutung des Lungenkollektins Surfactant-Protein A und D für die Toll-like-Rezeptor-Agonisten-modulierte allergische Entzündung

SFB 587 "Immunreaktionen der Lunge bei Infektion und Allergie"

Neuroimmune Interaktion beim Asthma bronchiale. Projekt B4

Interaktion zwischen pulmonalem Surfactant-System und allergischer Entzündung beim Asthma bronchiale. Projekt B8

Zelluläre Beeinflussung der allergischen Entzündung beim Asthma. Projekt B9

Lungenfunktionsmessungen. Projekt Z2

Umweltbundesamt

Verfahren der gesundheitlichen Stoffbewertung des FB II – ein Methodenvergleich von nationalen und internationalen Bewertungsgrundlagen. FuE-Vorhaben 363 01 274

Kanzerogenität und Mutagenität von Nanopartikeln – Bewertung des bisherigen Wissens als eine Grundlage für eine Regulation. FuE-Vorhaben 3709 61 220

Toxikologie von Nanopartikeln, Wirkmechanismen und Kanzerogenität. FuE-Vorhaben 3710 62 221

Human-Biomonitoring von "neuen" Schadstoffen (GUB), Teilvorhaben 1: Erstellung von Stoffdossiers für fünf Stoffe/Stoffgruppen. FuE-Vorhaben 3710 62 220 1

Untersuchung von nicht-lipidbasiertem Bioakkumulationsverhalten von Stoffen. FuE-Vorhaben 3711 63 405/01

Entwicklung von wirksamen Maßnahmen zur Verringerung des Umwelt- risikos von Tier- und Humanarzneimitteln. FuE-Vorhaben 3709 65 403

International International

EU project: ACuteTox

Research project for alternative testing

EU project: ARIMMORA

Advanced research on interaction mechanisms of electromagnetic exposures with organisms for risk assessment

EU project: Chemscreen

Chemical substance in-vitro/in-silico screening system to predict human- and ecotoxicological effects

EU project: Detective

Detection of endpoints and biomarkers for repeated-dose toxicity using in-vitro systems

EU project: Emphysema versus Airway Disease (EvA)

Markers for emphysema versus airway disease in COPD

EU project: E-TEAM

Evaluation of tier 1 exposure assessment models under REACH

EU project: Innovative Medicines Initiative (IMI) "Understanding Severe Asthma"

Unbiased biomarkers for the prediction of respiratory disease outcomes (U-BIOPRED)

WP3 Cross-sectional and longitudinal cohort

WP4 Bronchoscopy studies

WP5 Clinical models

WP6 Pre-clinical laboratory models

EU project: NANODEVICE

Novel concepts, methods, and technologies for the production of portable, easy-to-use devices for the measurement and analysis of airborne engineered nanoparticles in workplace air

EU project: OPENTOX

An interoperable predictive toxicology framework

EU project: OSIRIS

Optimized strategies for risk assessment of industrial chemicals through integration of non-test and test information

EU project: SEAWIND

Sound exposure and risk assessment of wireless network devices

EU project: SENS-IT-IV

Novel testing strategies for in-vitro assessment of allergens

EU project: SILICOAT

Industrial implementation of processes to render RCS safer in manufacturing processes

KOOPERATIONEN MIT INSTITUTIONEN UND HOCHSCHULEN

COOPERATION WITH INSTITUTIONS AND UNIVERSITIES

National National

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA), Berlin und Dortmund

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz

Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG), Referat Biochemie/Ökotoxikologie (G3), Koblenz

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, Bonn

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

Charité für Pädiatrie m. S. Pneumologie und Immunologie, Berlin
– Institut für Arbeitsmedizin
– Institut für Klinische Pharmakologie

Deutsches Primatenzentrum, Göttingen

Forschungszentrum Borstel
– Abteilung Klinische Medizin, Laborgruppe Molekulare und Klinische Allergologie
– Abteilung Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie, Laborgruppe Lungenpharmakologie

Georg-August-Universität Göttingen, Zentrum für Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Pharmakologie

Hannover Clinical Trial Center (HCTC), Hannover

Helmholtz-Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Abteilung Vakzinologie und angewandte Mikrobiologie

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ, Leipzig

Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der Ruhr-Universität Bochum (IPA)

Institute of Pharmacology and Preclinical Drug Safety (IPAS), Nycomed GmbH, Barsbüttel

Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Anatomie und Zellbiologie

Krankenhaus Großhansdorf, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie

Leibniz Universität Hannover, Institut für Anorganische Chemie

Medizinische Hochschule Hannover
– Abteilung Anatomie
– Abteilung Dermatologie
– Abteilung Diagnostische Radiologie
– Abteilung Immunologie
– Abteilung Klinische Pharmakologie
– Abteilung Pädiatrische Pneumologie
– Abteilung Pneumologie
– Abteilung Zahnerhaltung und Paradontologie
– Exzellenzcluster REBIRTH

RWTH Aachen, Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Technische Universität Braunschweig
– Institut für Pharmazeutische Technologie
– Institut für Biotechnologie

Technische Universität Clausthal-Zellerfeld, Institut für Mechanische Verfahrenstechnik

Tierärztliche Hochschule Hannover
– Institut für Pathologie
– Institut für Tierschutz und Verhalten

TWINCORE, Zentrum für Experimentelle und Klinische Infektionsforschung, Hannover

Universität Freiburg, Abteilung Pneumologie

Universität Konstanz, Molekulare Toxikologie

Universität Leipzig, Institut für Pharmazie

Universität Mainz, Abteilung Pneumologie

Universität Rostock, Medizinische Fakultät/Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Abteilung für Pneumologie

Universität Ulm, Institut für Humangenetik

Zentrum für Allergie- und Umweltmedizin (ZAUM), München

International International

BioME W. L. L., Manama (Bahrain)

Environmental Risk and Health Unit, Flemish Institute for Technological Research (VITO NV), Centre for Advanced R&D on Alternative Methods (CARDAM), Boeretang (Belgium)

Fraunhofer USA – Center for Molecular Biotechnology, Newark, DE (USA)

GlaxoSmithKline Services Unlimited, Brentford (UK)

Health Canada, Ottawa (Canada)

Hebrew University of Jerusalem, School of Pharmacy, Jerusalem (Israel)

Imperial College, London (UK)

Istituto Superiore di Sanità Rome (Italy)

IT'IS Foundation for Research on Information Technologies in Society, Zurich (Switzerland)

Johns Hopkins Asthma and Allergy Center, Baltimore, MD (USA)

McMaster University Medical Centre, Hamilton, Ontario (Canada)

National Institute of Cancer Research, Genoa (Italy)

National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), Research Triangle Park, NC (USA)

National Institutes of Health, New Bethesda, MD (USA)

OECD QSAR Expert Group (France)

Queensland Clinical Trials Network (QCTN), Toowong, Queensland (Australia)

RIVM National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven (The Netherlands)

TNO Quality of Life, Zeist (The Netherlands)

University of Amsterdam, Academic Medical Center (The Netherlands)

University of Basel, Institute of Biochemistry and Genetics (Switzerland)

University of Kazan (Russia)

University of Milan, Department of Organic Chemistry (Italy)

University of North Carolina, Chapel Hill, NC (USA)

University of Oklahoma Health Sciences Center, Department of Medicine, Pulmonary and Critical Care Division, Oklahoma City (USA)

University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia, PA (USA)

University of Siena, Faculty of Pharmacy (Italy)

University of Southampton (UK)

University of Trento (Italy)

University of Uppsala (Sweden)

University of Virginia, Charlottesville, VA (USA)

US Environmental Protection Agency (EPA), Chapel Hill, NC (USA)

US Environmental Protection Agency (EPA), Washington, DC (USA)

World Health Organization (WHO), Geneva (Switzerland)

GASTWISSENSCHAFTLER **VISITING SCIENTISTS**

Dr. C. Frieke Kuper

TNO Research Group Quality and Safety, Zeist (The Netherlands)

Colin Mitchell

VOCscan AG, Mellingen (Switzerland)

Prof. Dr. Shamil Zaripov

University of Kazan (Russia)

PREISE FÜR WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN **PRIZES FOR SCIENTIFIC WORK**

Monika Batke

Bestes Poster mit dem Titel »ITS RepDose: A functional integrated testing strategy for the endpoint repeated dose toxicity«.
Jahrestagung der EPAA. Brüssel (Belgien), 9. November 2011
Best poster award for "ITS RepDose: A functional integrated testing strategy for the endpoint repeated dose toxicity".
Annual Conference of the European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing (EPAA). Brussels (Belgium), November 9, 2011

Christoph Klein

Dr.-Josef-Steiner-Krebsforschungspreis 2011 für seine grundlegenden Arbeiten zur Entdeckung und molekularen Analyse von zirkulierenden Krebszellen in Patienten.
Bern (Schweiz), 7. Oktober 2011
Dr. Josef Steiner Cancer Research Prize 2011 for his basic research into the detection and molecular analysis of disseminated cancer cells in patients.
Bern (Switzerland), October 7, 2011

Katharina Schwarz

Bester Vortrag mit dem Titel »Single Breath Particle Size Characterization – a Technique for Detection of Alterations in Small Airway Physiology?«
18. Kongress der Internationalen Gesellschaft für Aerosole in der Medizin, Rotterdam (Niederlande), 18.-22. Juni 2011
Best oral presentation award for "Single Breath Particle Size Characterization – a Technique for Detection of Alterations in Small Airway Physiology?"
18th Congress of the International Society for Aerosols in Medicine, Rotterdam (The Netherlands), June 18-22, 2011

MESSEN, KONGRESSE UND SEMINARE

EXHIBITIONS, CONGRESSES, AND WORKSHOPS

October 11-13, 2011

Biotechnica 2011

Hannover (Germany)

June 28-30, 2011

BIO International Convention 2011

Washington D. C. (USA)

March 23-24, 2011

Forum Life Science 2011

Munich (Germany)

March 6-10, 2011

SOT 2011

Annual Meeting of the Society of Toxicology

Washington D. C. (USA)

February 8-10, 2011

HuLST Expo

Trade fair for manufacturing tests in the life sciences

Cologne (Germany)

January 21-22, 2011

10th Workshop "Models of Asthma and COPD"

Fraunhofer ITEM, Hannover (Germany)

IMPRESSUM

IMPRINT

Koordination und redaktionelle Bearbeitung

Coordination and editorial work

Dr. Cathrin Nastevska

Übersetzung

Translation

Karin Schlemminger

Bildmaterial

Photographs and illustrations

Adimas, Fotolia (Seite/pages 43, 125)

Helvi Grimm (Seite/pages 14, 96 oben/top)

Nico Herzog (Seite/pages 37, 119 oben/top)

Jörg Horstmann, Panthermedia (Seite/pages 71, 153 links/left)

Rainer Meier (BFF)

MEV-Verlag GmbH (Seite/pages 70, 153 oben links/top left;

75, 157 oben/top)

Ralf Mohr

Susanne Müller (Seite/page 21, 103 links/left)

Priv.-Doz. Dr. Jens Vogel-Claussen (Seite/pages 44, 45, 126, 127 oben/top)

Womue, Fotolia (Seite/pages 59, 141)

Alle übrigen Bilder und Abbildungen: ©Fraunhofer ITEM, Fraunhofer-Gesellschaft.

All other photographs and illustrations: ©Fraunhofer ITEM, Fraunhofer-Gesellschaft.

Alle Rechte vorbehalten. Nachdruck nur mit Genehmigung des Fraunhofer ITEM.

All rights reserved. Reproduction only with permission from Fraunhofer ITEM.

© Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin
Hannover 2012

KONTAKT: MARKETING UND PR

CONTACTS: MARKETING AND PR



Dr. Franz Drenk

Telefon +49 511 5350-402

franz.drenk@item.fraunhofer.de



Dr. Cathrin Nastevska

Telefon +49 511 5350-225

cathrin.nastevska@item.fraunhofer.de



Karola Neubert

Telefon +49 511 5350-413

karola.neubert@item.fraunhofer.de

Fraunhofer-Institut für Toxikologie und
Experimentelle Medizin ITEM
Nikolai-Fuchs-Straße 1
30625 Hannover
Haupteingang: Stadtfelddamm
Telefon +49 511 5350-0
Fax +49 511 5350-155
info@item.fraunhofer.de
www.item.fraunhofer.de

Fraunhofer ITEM
Pharmazeutische Biotechnologie
Inhoffenstraße 7
38124 Braunschweig
Telefon +49 531 6181-6001
Fax +49 531 6181-6199
info@item.fraunhofer.de
www.item.fraunhofer.de