

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. Januar 2009 (08.01.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/003441 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12M 1/04 (2006.01) C12M 3/04 (2006.01)
C12M 1/26 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)

[DE/DE]; Fallingbosteler Strasse 2, 30625 Hannover (DE). RITTER, Detlef [DE/DE]; Rosskampstrasse 56, 30519 Hannover (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2008/001007

(74) Anwälte: KÖRNER, Andreas usw.; Thömen & Körner, Zeppelinstrasse 5, 30175 Hannover (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Juni 2008 (16.06.2008)

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2007 030 413.9 29. Juni 2007 (29.06.2007) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Hansastrasse 27c, 80686 München (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KNEBEL, Jan

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR ANALYSING THE EFFECT OF A GASEOUS MEDIUM ON A BIOLOGICAL TEST SYSTEM USING AN EXTRACELLULAR METABOLISATION SYSTEM AND DEVICE FOR CARRYING OUT SAID METHOD

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG EINES GASFÖRMIGEN MEDIUMS AUF EIN BIOLOGISCHES PRÜFSYSTEM UNTER VERWENDUNG EINES EXTRAZELLULÄREN METABOLISIERUNGSSYSTEMS SOWIE VORRICHTUNG ZUR DURCHFÜHRUNG DES VERFAHRENS

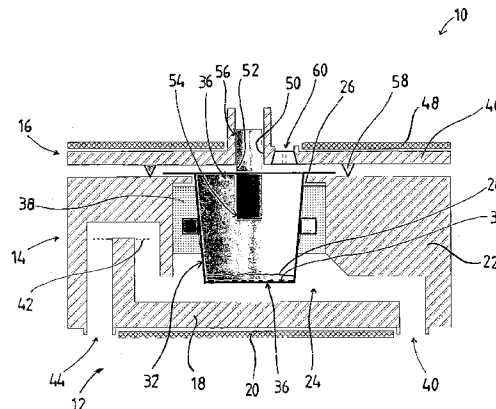


FIG. 1

(57) Abstract: The invention relates to a method for analysing the effect of a gaseous medium on a biological test system using an extracellular metabolisation system. Said method consists of the following steps: a biological test sample is cultivated on a permeable carrier, the gaseous medium is guided over the surface of the biological test system in order to form an exposition atmosphere over the biological test system, the extracellular metabolisation system is added to a conservation medium and the permeable carrier is brought into contact with a conservation medium that comprises the extracellular metabolisation system below the permeable carrier, in such a manner that the extracellular metabolisation system only passes through the permeable carrier and that the biological test system is not submerged by the conservation medium containing the extracellular metabolisation system.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2009/003441 A2



ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)*

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)*

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem unter Verwendung eines extrazellulären Metabolisierungssystems, umfassend folgende Verfahrensschritte Anzüchtung eines biologischen Prüfsystems auf einem permeablen Träger Leiten des gasförmigen Mediums über die Oberfläche des biologischen Prüfsystems zur Bildung einer Expositionsatmosphäre oberhalb des biologischen Prüfsystems Zugabe des extrazellulären Metabolisierungssystems zu einem Erhaltungsmedium Positionierung des Erhaltungsmediums mit extrazellulärem Metabolisierungssystem unterhalb des permeablen Trägers mit Kontakt zum permeablen Träger, derart, dass das extrazelluläre Metabolisierungssystem nur durch den permeablen Träger durchtritt, das biologische Prüfsystem jedoch nicht vom Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem überschwemmt wird.

Verfahren zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem unter Verwendung eines extrazellulären Metabolisierungssystems sowie Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem unter Verwendung eines extrazellulären Metabolisierungssystems sowie Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

Es ist bekannt, zelluläre Prüfsysteme in Form von Eukaryonten-Kulturen, insbesondere Zelllinien, Primärzellen, Biopsien, Lavagen, Isolate, PCLS und dergleichen, ex-vivo Luft getragenen Substanzen nativer oder künstlicher Art auszusetzen, um die biologische Wirkung dieser Substanzen zu untersuchen. Die Eukaryonten-Kulturen werden hierbei einer künstlichen oder natürlichen Prüfatmosphäre, auch Expositionsatmosphäre genannt, ausgesetzt.

Da häufig erst die Stoffwechselzwischenprodukte der genannten Luft getragenen Substanzen biologisch aktiv sind, wird eine biologische Wirkung der Prüfatmosphäre im zellulären Prüfsystem erst nachweisbar, wenn die genannten Stoffwechselzwischenprodukte im Zuge einer Metabolisierung der genannten Luft getragenen Substanzen gebildet werden konnten.

Nachfolgend sind beispielhaft zelluläre Prüfsysteme genannt, bei denen eine intrazelluläre Metabolisierungskapazität unterstellt oder nachgewiesen wurde:

- (a) Isolate von Primärzellen mit recht unterschiedlich definierten und in Abhängigkeit von der jeweiligen Isolierungstechnik und dem Isolierungsbatch verschieden vorhandenen Metabolisierungsfähigkeiten/-kapazitäten (z.B. Hepatozyten der Rattenleber oder von humanen Biopsien; M.J. Gómez-Lechón et al., Hepatocytes – the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: In vitro variability as a reflection of in vivo, *Chemico-Biol. Int.* (2006), doi: 10.1016/j.cbi.2006.19.013)

- (b) immortalisierte Hepatozyten-Zelllinien, die je nach Subpopulation eine unterschiedliche Metabolisierungsfähigkeit/-kapazität besitzen können (z.B. die humane Hepatomzelllinie HepG2; Aden et.al. 1979)
- (c) gentechnologisch veränderte Zellsysteme (z.B. von V79 abgeleitete Zelllinien mit definierter Expression spezifischer Cytochrom P-450 Formen; A. Townsend et al., Modeling the metabloc competency of glutathione S-transferases using genetically modified cell lines, Toxicology 181 – 182 (2002) 265 – 269; N. Krebsfaenger et al., V79 Chinese Hamster Cells Genetically Engineered für Polymorphic Cytochrome P450 2D6 and their Predictive Value for Humans, ALTEX 20, 3/03, 143 - 154).
- (d) Kokulturen von metabolisch kompetenten Zellen und nicht metabolisierenden Zellen des primären Zielgewebes der Noxe (S. Bremer et al., Detection of the Embryotoxic Potential of Cyclophosamide by Using a Combined System of Metabolic Competent Cells and Embryonic Stem Cells, ATLA 30, 77- 85, 2002).
- (e) Gewebeschnitte (D.S. Pushparajah et al., Evaluation of the precision-cut liver and lung slice systems for the study of induction of CYP1, epoxide hydrolase and glutathione S-transferase activities, Toxicology 231 (2007) 68 – 80).

Nachteilig an diesen zellulären Prüfsystemen mit intrazellulärem Metabolisierungssystem können die Aufwendigkeit der Kulturverfahren sowie die Verfügbarkeit und Reproduzierbarkeit der Metabolisierungseffizienz sein.

Grundsätzlich erfüllen die vorgenannten zellulären Prüfsystemen mit intrazellulärem Metabolisierungssystem auch nicht zwingend die Anforderungen, die durch diverse internationale Prüfvorschriften, beispielsweise der "OECD Guideline for the Testing of Chemicals" Nr. 473, gestellt werden, welche die Gegenwart eines ausreichend effizienten Metabolisierungssystems fordern.

Um diese Prüfvorschriften zu erfüllen, können bekanntermaßen zelluläre Prüfsysteme ohne intrazelluläre Metabolisierung oder zelluläre Prüfsysteme, bei denen

die Effizienz der intrazellulären Metabolisierung nicht nachgewiesen wurde, verwendet werden, die in Kulturflaschen mit ebenen Boden oder in runden Kulturflaschen, so genannten Roller-Bottles, exponiert werden. Dabei wird das zelluläre Prüfsystem mit einem Gemisch aus einem Erhaltungsmedium und einem extrazellulärem Metabolisierungssystem überschichtet und die Prüfatmosphäre kontinuierlich durch die Flasche geleitet. Zum Erreichen einer Durchmischung von Erhaltungsmedium, extrazellulärem Metabolisierungssystem und Prüfatmosphäre werden die Kulturflaschen geschüttelt, gekippt oder gedreht.

Nachteilig an diesem Verfahren ist, dass kein unmittelbarer und definierter Kontakt zwischen Prüfatmosphäre und zellulärem Prüfsystem möglich ist. Das Ergebnis ist daher mit einer geringeren Sensitivität und Spezifität sowie mit einem Fehlen einer exakten Dosimetrie behaftet.

Ausgehend von diesem Stand der Technik liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein alternatives Verfahren mit hoher Sensitivität und Selektivität zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem unter Verwendung eines extrazellulären Metabolisierungssystems sowie eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem unter Verwendung eines extrazellulären Metabolisierungssystems gemäß den Merkmalen des Anspruchs 1 sowie durch eine Expositionsvorrichtung gemäß den Merkmalen des Anspruchs 5 gelöst. Weiterbildungen und vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem unter Verwendung eines extrazellulären Metabolisierungssystems, umfasst folgende Verfahrensschritte:

- Anzuchtung eines biologischen Prüfsystems auf einem permeablen Träger

- Leiten des gasförmigen Mediums über die Oberfläche des biologischen Prüfsystems zur Bildung einer Expositionsatmosphäre oberhalb des biologischen Prüfsystems
- Zugabe des extrazellulären Metabolisierungssystems zu einem Erhaltungsmedium
- Positionierung des Erhaltungsmediums mit extrazellulärem Metabolisierungssystem unterhalb des permeablen Trägers mit Kontakt zum permeablen Träger, derart, dass das extrazelluläre Metabolisierungssystem nur durch den permeablen Träger durchtritt, das biologische Prüfsystem jedoch nicht vom Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem überschwemmt wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht mit hoher Sensitivität und Selektivität die Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem unter Verwendung eines extrazellulären Metabolisierungssystems.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden die folgenden, als erfindungswesentlich erkannten, für die hohe Sensitivität und Selektivität des Verfahrens verantwortlichen und während der Exposition des biologischen Prüfsystems in der Expositionsatmosphäre gleichzeitig einzuhaltenden Bedingungen erfüllt:

- a) Herstellung eines direkten und ungehinderten Kontaktes zwischen Expositionsatmosphäre und biologischem Prüfsystem
- b) Herstellung eines Kontaktes zwischen der Expositionsatmosphäre und dem extrazellulären Metabolisierungssystem
- c) Zugänglichmachen der Reaktionsprodukte der Metabolisierungsreaktionen der Expositionsatmosphäre mit dem extrazellulären Metabolisierungssystem für das biologische Prüfsystem
- d) Zugänglichmachen des Erhaltungsmediums für das biologische Prüfsystem
- e) Erhalt der Vitalität des biologischen Prüfsystems

Unabhängig davon, ob das biologische Prüfsystem intrazelluläre Metabolisierungsfähigkeiten aufweist oder ob intrazelluläre Metabolisierungsfähigkeiten im biologischen Prüfsystem vollständig fehlen, zu gering ausgeprägt, zu wenig reproduzierbar oder zu wenig spezifisch definiert sind, wird durch das erfindungsgemäße Verfahren unter Verwendung eines definierten, extrazellulären Metabolisierungssystems die Metabolisierungsfähigkeit sichergestellt.

Wichtig ist, dass quasi durch die Grenzschicht aus permeablem Träger mit darauf exponiertem biologischen Prüfsystem die Kompartimente "Expositionsatmosphäre" und "Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem" physikalisch voneinander getrennt sind, so dass das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem in erfindungsgemäß vorgegebener Weise nur durch den permeablen Träger durchtreten kann.

Unter einem Erhaltungsmedium im Sinne der Erfindung wird hier und im Folgenden ein Kulturmedium, auch als Nährmedium bezeichnet, mit oder ohne Zusätzen oder eine Salzlösung verstanden.

Das gasförmige Medium kann im Sinne der Erfindung als reines Gas oder Gasgemisch vorliegen, d. h. alle darin enthaltenen Stoffe (Atome, Moleküle, etc.) befinden sich in der Gasphase, und/oder es kann auch als Träger für Fest- und/oder Flüssigstoffe dienen. Insbesondere können so Aerosole, zerstäubte Flüssigkeiten, kleine Flüssigkeitströpfchen (z. B. Pflanzenschutzmittel als Sprühnebel, etc.), Schwebeteilchen, Feststoffpartikel (z. B. Holzstaub, etc.), gasförmige Suspensionen, zerstäubte Suspensionen oder Emulsionen als zu tragende Substanzen in dem Trägergas enthalten sein.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist es auf technisch einfache Art und in Routineanwendungen möglich, mit biologischen Prüfsystemen, die unter Umständen keine eigene Metabolisierungskapazität besitzen, sicher, d.h. unter Vitalitätserhalt, mit hoher Sensitivität des Verfahrens aufgrund des intensiven Kontakts der Expositionsatmosphäre sowohl mit dem biologischen Prüfsystem als auch mit dem

extrazellulären Metabolisierungssystem und insbesondere unter Einhaltung diverser internationaler Prüfvorschriften, beispielsweise der dem Fachmann bekannten OECD 473, Untersuchungen der biologischen Wirkung von gasförmigen Medien aller Art durchzuführen.

Daneben ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren die Verwendung von individuell hergestellten Zusammensetzungen diverser externer, dem Fachmann bekannter Metabolisierungssysteme, beispielsweise mit Cytochromen von Labornagern oder vom Menschen, die auf die verschiedenen spezifischen Stoffwechseleigenheiten eines biologischen Prüfsystems gezielt abgestimmt sein können.

Es wird im Sinne der Erfindung vorzugsweise ein permeabler Träger verwendet, der derart ausgebildet ist, dass er einerseits zur Aufnahme des biologischen Prüfsystems geeignet ist und andererseits eine Trennung der gasförmigen Phase, also der Expositionsatmosphäre, von der flüssigen Phase, also des Erhaltungsmediums mit extrazellulärem Metabolisierungssystem, ermöglicht. Mithin kann die Porengröße und Porendichte des permeablen Trägers in Abhängigkeit vom der Art des biologischen Prüfsystems und der Art sowie Viskosität des Erhaltungsmediums variieren.

Vorzugsweise wird als permeabler Träger eine mikroporöse Membran verwendet. Vorzugsweise wird als permeabler Träger ein Gel verwendet. Zur Aufnahme des biologischen Prüfsystems kann auch ein Kulturgefäß, beispielsweise ein kommerziell erhältliches so genanntes Cell Culture Insert, vorgesehen sein, wobei der permeable Träger die Bodenmembran des Kulturgefäßes bildet.

Eine Weiterbildung der Erfindung ist gekennzeichnet durch folgenden weiteren Verfahrensschritt:

- Regulierung des Durchtritts des dem Erhaltungsmedium zugegebenen extrazellulären Metabolisierungssystems durch den permeablen Träger durch

Vorgeben eines bestimmten, auf das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem einwirkenden Drucks.

Weiterhin ist vorgesehen, dass der auf das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem einwirkende Druck derart gewählt wird, dass das extrazelluläre Metabolisierungssystem durch den permeablen Träger durchtritt, das biologische Prüfsystem jedoch nicht vom Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem überschwemmt wird.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung ist durch folgenden weiteren Verfahrensschritt gekennzeichnet:

- Regulierung der Verdunstungsrate über dem biologischen Prüfsystem durch Vorgeben einer bestimmten Temperatur im unmittelbaren Umgebungsbereich des biologischen Prüfsystems und/oder Vorgeben einer bestimmten Strömungsgeschwindigkeit des über die Oberfläche des biologischen Prüfsystems strömenden gasförmigen Mediums.

Durch die Temperierung, vorzugsweise im unmittelbaren Umgebungsbereich des biologischen Prüfsystems, lässt sich die Verdunstungsrate des durch die permeable Membran durchtretenden Erhaltungsmediums mit extrazellulärem Metabolisierungssystem regulieren, um so ein Austrocknen und damit ein Absterben des biologischen Prüfsystems zu verhindern.

Die Verdunstungsrate ist auch abhängig vom Feuchtigkeitsgehalt des gasförmigen Mediums. Eine entsprechende Regulierung oder Steuerung der Strömungsgeschwindigkeit des gasförmigen Mediums über dem biologischen Prüfsystem ist erforderlich.

Die Regulierung und Steuerung dieser beiden vorgenannten Parameter sowie des auf das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem einwirkenden Drucks schafft definierte Bedingungen zur Untersuchung der Wirkung ei-

nes gasförmigen Medium auf ein biologisches Prüfsystem unter Verwendung eines extrazellulären Metabolisierungssystems.

Die Erfindung betrifft außerdem eine Expositionsvorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend

- mindestens einen permeablen Träger, auf dem ein biologisches Prüfsystem angezüchtet ist,
- mindestens ein Zuleitungssystem, über das ein gasförmiges Medium über die Oberfläche des biologischen Prüfsystems zur Bildung einer Expositionsatmosphäre oberhalb des biologischen Prüfsystems leitbar ist
- ein Zuführsystem, das ein Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem enthält und derart ausgebildet ist, dass das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem in direktem Kontakt mit der Unterseite des permeablen Trägers steht, wobei
- der permeable Träger derart ausgebildet und innerhalb der Expositionsvorrichtung angeordnet ist, dass dieser das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem physikalisch von der Expositionsatmosphäre trennt, wobei
- das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem mittels eines vorgegebenen Drucks definiert nur durch den permeablen Träger drückbar ist, nämlich derart, dass das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem durch den permeablen Träger durchtritt, das biologische Prüfsystem jedoch nicht vom Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem überschwemmt wird.

Das Zuleitungssystem umfasst alle Vorrichtungen, die geeignet sind, das gasförmige Medium über die Oberfläche des biologischen Prüfsystems zur Bildung einer Expositionsatmosphäre oberhalb des biologischen Prüfsystems zu leiten. Eine derartige Vorrichtung ist beispielsweise aus der DE 100 14 057 A1 bekannt. Die Offenbarung dieser Patentanmeldung wird hiermit durch Bezugnahme vollinhaltlich in die vorliegende Anmeldung mit aufgenommen.

Das Zuleitungssystem umfasst vorzugsweise auch alle Vorrichtungen, die durch ihre Konstruktion die Heranführung des gasförmigen Mediums in besonderer Art realisieren, beispielsweise mit hyperbolischem Innenprofil zur gezielten Abscheidung von Aerosoltröpfchen.

Ferner umfasst das Zuleitungssystem vorzugsweise auch Vorrichtungen zur elektrostatischen Abscheidung von Partikeln oder Tröpfchen und/oder eine Aufladungsvorrichtung. Derartige Vorrichtungen sind beispielsweise aus der DE 195 26 533 A1 bekannt. Die Offenbarung dieser Patentanmeldung wird hiermit ebenfalls durch Bezugnahme vollinhaltlich in die vorliegende Anmeldung mit aufgenommen.

Einer Weiterbildung der Erfindung sieht vor, dass das Zuführsystem gegenüber dem Zuleitungssystem und der Expositionsatmosphäre abgedichtet ist und lediglich durch den permeablen Träger hindurch das Erhaltungsmedium samt extrazellulärem Metabolisierungssystem mit der Expositionsatmosphäre in Kontakt treten kann.

Der vorgegebene Druck ist erfindungsgemäß hydrostatisch oder mittels wenigstens einer Pumpe oder anderer Druck erzeugender Mittel einstellbar.

Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung ist das Zuführsystem derart ausgebildet ist, dass das darin enthaltene Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem für die Dauer der Untersuchung im Zuführsystem verbleibt.

Vorzugsweise ist der permeable Träger derart ausgebildet, dass er einerseits die Aufnahme des biologischen Prüfsystems und andererseits eine Trennung der gasförmigen Phase, also der Expositionsatmosphäre, von der flüssigen Phase, also des Erhaltungsmediums mit extrazellulärem Metabolisierungssystem, ermöglicht. Letzteres ist insbesondere abhängig von der Art des biologischen Prüfsystems sowie der Art und Viskosität des Erhaltungsmediums mit extrazellulärem Metabolisierungssystem.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung sieht vor, dass ein Ableitungssystem vorgesehen ist, über das die Expositionsatmosphäre nach einer vorgegebenen Verweilzeit innerhalb der Expositionsvorrichtung aus dieser ableitbar ist.

Weiterhin ist vorgesehen, dass das Zuleitungs- und/oder Ableitungssystem derart ausgebildet ist, dass das gasförmige Medium kontrolliert mittels eines Unterdruck-Systems oder eines Überdruck-Systems durch die Expositionsvorrichtung leitbar ist.

Bevorzugtes Mittel zum kontinuierlichen Erzeugen einer entsprechenden Druckdifferenz zwischen Zuleitungs- und/oder Ableitungssystem ist eine Pumpe, die mit strömungstechnisch im Ableitungssystem angeordnet ist. Zum vorteilhaften Einstellen der Strömungsgeschwindigkeit des Mediums ist die Pumpe in ihrer Pumpleistung dabei besonders bevorzugt steuerbar.

Zweckmäßigerweise ist gemäß einer Weiterbildung der Erfindung ein Abfuhrsystem vorgesehen, über das das Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem nach einer vorgegebenen Verweilzeit innerhalb der Expositionsvorrichtung aus dieser abführbar ist.

Vorzugsweise ist das Zuführ- und Abfuhrsystem derart ausgebildet, dass das darin enthaltene Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem in einem kontinuierlichen oder pulsierenden Fluss durch das Zuführ- und Abfuhrsystem geführt wird, wobei zu diesem Zweck vorzugsweise wenigstens eine Pumpe vorgesehen ist.

Gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung ist wenigstens eine Heizvorrichtung vorgesehen, durch die die Expositionsvorrichtung ganz oder teilweise temperierbar ist.

Durch die Temperierung, vorzugsweise im unmittelbaren Umgebungsbereich des biologischen Prüfsystems, lässt sich die Verdunstungsrate des durch die per-

meable Membran durchtretenden Erhaltungsmediums mit extrazellulärem Metabolisierungssystem regulieren, um so ein Austrocknen und damit ein Absterben des biologischen Prüfsystems zu verhindern.

Die Verdunstungsrate ist auch abhängig vom Feuchtigkeitsgehalt des gasförmigen Mediums. Eine entsprechende Regulierung oder Steuerung der Strömungsgeschwindigkeit des gasförmigen Mediums über dem biologischen Prüfsystem ist erforderlich.

Gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung umfasst die erfindungsgemäße Expositionsvorrichtung entsprechend auch eine Vorrichtung zur Regulierung und Steuerung der Strömungsgeschwindigkeit des gasförmigen Mediums über dem biologischen Prüfsystem.

Die Regulierung und Steuerung dieser beiden vorgenannten Parameter sowie des erforderlichen auf das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem einwirkenden Drucks schafft definierte Bedingungen zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem unter Verwendung eines extrazellulären Metabolisierungssystems.

Vorzugsweise ist das verwendete biologische Prüfsystem entweder eine Eukaryonten-Kultur, besonders bevorzugt Zelllinien, Primärzellisolate, Gewebeschnitte, rekonstruierte Gewebe wie Kokulturen, oder genetisch veränderte Zellen, oder eine Prokaryonten-Kultur. Vorzugsweise wird ein solches biologisches Prüfsystem bei dem zuvor genannten erfindungsgemäßen Verfahren verwendet.

Eine Weiterbildung der Erfindung sieht vor, dass die Expositionsvorrichtung mit einer zellbasierten Sensorik kombiniert ist.

Unter dem Begriff "zellbasierter Sensorik" werden alle Vorrichtungen verstanden, die geeignet sind, den biologischen Status der eingesetzten biologischen Prüfsys-

teme während ihrer Positionierung auf dem permeablen Träger in der Expositions-
vorrichtung zu untersuchen.

Insbesondere kann dies in Form einer Online-Messung realisiert sein oder einer
Analytik, die geeignet ist, innerhalb von Intervallen kürzeren oder längeren zeitli-
chen Abstandes einen Messwert auszulesen.

Zellbasierte Sensorik kann z.B. für Endpunkte realisiert werden, die auf dem Ein-
satz einer Fluoreszenz- oder Lumineszenzmessung basieren. Dazu wird das bio-
logische Prüfsystem z.B. mit einem Fluorophor ausgestattet, dessen Eigenschaf-
ten in Abhängigkeit vom zellulären Zustand stehen und diesen daher über die Flu-
oreszenzanalytik unter bestimmten Aspekten abbilden können, beispielsweise
durch Anfärbung der Zellen mit H₂DCFDA zum Nachweis intrazellulärer Radikal-
bildung. Mittels einer geeigneten Optik, beispielsweise einer Lichtleitertechnik, und
externer Lichtquelle und Detektor sowie Steuereinrichtung und Messwertaufnah-
me kann dann direkt am biologischen Prüfsystem auf der Membran die Lichtenre-
gung, also Excitation, und Emissionsmessung, also Emission, stattfinden. Eine
entsprechende Einrichtung kann z.B. auch für die Analyse von Lumineszenzer-
scheinungen z.B. im Zusammenhang mit Expressionsanalysen, beispielsweise
Reportergen-Assays, vorgesehen sein.

Zellbasierte Sensorik kann beispielsweise auch durch elektrische oder elektro-
chemische Messungen realisiert werden, insbesondere in Form einer elektrischen
Widerstandmessung, also TEER, trans epithelial electrical resistance, oder in
Form einer Impedanz-Messung.

Eine weitere Ausführung zellbasierter Sensorik kann auch eine Einrichtung sein,
die geeignet ist, von der Zelle abgegebene Substanzen, beispielsweise Enzyme
wie Lactat-Dehydrogenase oder Zytokine, im Erhaltungsmedium quantitativ oder
qualitativ zu analysieren.

Insbesondere sind diese Einrichtungen geeignet, eine Analytik während eines Expositionsvorganges zuzulassen.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder der Expositionsvorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 16 zur Exposition wenigstens eines biologischen Prüfsystems in Zigarettenrauch oder dergleichen oder in Abgasen, vorzugsweise in Automobilabgasen oder in Industrieabgasen.

Die Erfindung betrifft außerdem die Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder der Expositionsvorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 16 zur Untersuchung von Umweltatmosphären, Arbeitsplatzatmosphären oder Innenraumatmosphären.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder der Expositionsvorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 16 zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem auf dem Gebiet Produktsicherheit, Verbraucherschutz, Pharmazeutik, Produktionsüberwachung oder Medizintechnik.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder der Expositionsvorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 16 zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem unter Einhaltung regulatorischer Richtlinien, vorzugsweise von OECD-Richtlinien.

Eine bevorzugte Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder der Expositionsvorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 16 ist die zulassungsrelevante Prüfung von technisch hergestellten Atmosphären, also beispielsweise Gaszubereitungen oder -mischungen, die für ihre Herstellung und den Vertrieb nach Chemikalienrecht eine behördliche Zulassung erfordern und deren Un-

bedenklichkeitsnachweise nach EU-Recht möglichst unter Verwendung von tierversuchsfreier Prüfungen durchzuführen sind.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder der Expositionsvorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 16 zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem, nämlich zur Untersuchung toxikologischer Effekte, gentoxischer Effekte, immunmodulatorischer oder immuntoxischer Effekte oder anderer biologisch oder toxikologisch relevanter zellulärer Veränderungen.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand eines Ausführungsbeispiels erläutert, dass in der Zeichnung dargestellt ist. In dieser zeigen

Fig. 1 schematisch eine Teilansicht einer zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Expositionsvorrichtung und

Fig. 2 einen schematischen Aufbau für eine mögliche Untersuchung der Wirkung von n-Butan auf ein biologisches Prüfsystem unter Verwendung eines extrazellulären Metabolisierungssystems.

Die in Fig. 1 schematisch in Teilansicht dargestellte Expositionsvorrichtung 10, die für Feldversuche auch transportierbar ist, weist eine Unterkonstruktion 12, eine auf der Unterkonstruktion 12 angeordnete Mittelkonstruktion 14 und eine auf der Mittelkonstruktion 14 angeordnete Oberkonstruktion 16 auf.

Die Unterkonstruktion 12 ist in Form einer Wanne 18 ausgebildet, die vorzugsweise aus einem Polycarbonat besteht. Unterhalb der Wanne 18 ist eine elektrische Heizvorrichtung 20 angeordnet, die eine Temperierung der Expositionsvorrichtung 10 ermöglicht.

Weiterhin sind ein hier nicht dargestellter Vorratsbehälter zum Aufnehmen eines Erhaltungsmediums mit erfindungsgemäß zugesetztem Metabolisierungssystem und eine hier nicht dargestellte Schlauchpumpe zum Fördern des Erhaltungsmediums mit Metabolisierungssystem vom Vorratsbehälter in die Wanne 18 vorgesehen.

Die Wanne 18 der Unterkonstruktion 12 ist mit einer Platte 22 der Mittelkonstruktion 14 unter Ausbildung wenigstens eines Hohlraums 24, dem das Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem zuführbar ist, dicht verbunden. Die Platte 22 besteht vorzugsweise aus einem Polycarbonat.

Es wird darauf hingewiesen, dass die Begriffe Wanne 18 und Platte 22 nicht so zu verstehen sind, dass die Wanne 18 immer einen Boden mit nach oben gezogenen Wänden aufweist und die Platte 22 nur flach ausgebildet ist. Im Grunde kann die Wanne 18 auch flach ausgebildet sein und die Platte 22 nach unten gezogene Wände aufweisen. Dies ist so beispielsweise in Fig. 1 dargestellt. Auch diverse Übergangsstadien zwischen Wanne 18 und Platte 22 mit diversen Profilierungen sind möglich.

Die Platte 18 weist weiterhin wenigstens ein Aufnahmemittel, vorliegend in Form eines Loches 26, für die Aufnahme eines mit einem biologischen Prüfsystem 28 versehenen, permeablen Trägers 30, vorliegend in Form eines Kulturgefäßes 32 auf.

Das in Fig. 1 dargestellte Kulturgefäß 32 hat eine becherartige Form mit kreisförmigem Querschnitt, wobei sich der Durchmesser von der Becheröffnung 34 bis zum Becherboden 36 konisch verjüngt. Der Becherboden 36 besteht aus einem porösen Kunststoffmaterial, zum Beispiel aus Polyethylenterephthalat. Das Kulturgefäß 32 stellt eine flüssigkeitsdurchlässige Tragstruktur für den permeablen Träger 30, insbesondere einer mikroporösen Membran 30 dar, die je nach Erfordernis der zu kultivierenden Zellen aus unterschiedlichen Kunststoffmaterialien herge-

stellt sein kann, z. B. ebenfalls Polyethylenterephthalat. Die mikroporöse Membran 30 trägt dabei das biologische Prüfsystem 28.

Jedes Kulturgefäß 32 ragt mit seinem Becherboden 36 in den durch Wanne 18 und Platte 22 gebildeten Hohlraum 24. Die Becheröffnung 34 befindet sich oberhalb der Platte 22.

Wichtig ist, dass das in jedem Loch 26 der Platte 18 aufgenommene Kulturgefäß 32 an der äußeren Becherwand gegenüber der Platte 18 mittels einer Dichtung 38, vorzugsweise mittels einer Silikonwulst, abgedichtet ist. Dies ist erfindungswesentlich, weil nur so sichergestellt werden kann, dass das Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem nur durch die mikroporöse Membran 30 durchtreten und mit der Expositionsatmosphäre in Kontakt treten kann. Dadurch wird mithin verhindert, dass das Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem am Kulturgefäß 32 vorbei nach oben gedrückt wird und dann nachteilig von oben in die Becheröffnung 34 und mithin in das Kulturgefäß 32 gelangt oder die Platte 18 überschwemmt.

Vorzugsweise erfolgt die Zufuhr des Erhaltungsmediums mit Metabolisierungssystem über eine Einlassöffnung 40 im Boden der Wanne 18. Das Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem füllt dann den Hohlraum 24 zwischen Wanne 18 und Platte 22 und kommt an der Unterseite der mikroporösen Membran 30 in Kontakt mit dieser 30. Um nun das Metabolisierungssystem im Erhaltungsmedium durch die mikroporöse Membran 30 zu dem auf der Membran 30 angezüchteten biologischen Prüfsystem 28 drücken zu können, muss Druck auf das Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem ausgeübt werden. Dies geschieht im einfachsten Fall hydrostatisch. Hierzu wird das Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem mittels der Schlauchpumpe auf ein Niveau 40 innerhalb des Hohlraums 24 gepumpt, das oberhalb des Becherbodens 36, also oberhalb der mikroporösen Membran 30, liegt. Durch vorzugsweises Verschieben des Kulturgefäßes 32, d.h. durch Verändern des Niveaus des permeablen Trägers 30, kann der Druck ebenfalls verändert werden.

Das erforderliche Niveau bzw. der erforderliche Druck, der notwendig ist, um das Metabolisierungssystem mit Erhaltungsmedium erfindungsgemäß durch die mikroporöse Membran 30 zu drücken, ist insbesondere abhängig von der Art der mikroporösen Membran 30, also von der Porengröße und Porendichte, und des verwendeten Erhaltungsmediums mit extrazellulärem Metabolisierungssystem. Der erforderliche Druck wird mithin empirisch ermittelt.

Vorzugsweise weist die Expositionsvorrichtung 10 im Boden der Wanne 18 eine Auslassöffnung 44 auf, über die verbrauchtes Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem aus der Expositionsvorrichtung 10 gelassen werden kann, vorliegend dadurch, dass das Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem das genannte Niveau 40 übersteigt.

Auf der Platte 22 der Mittelkonstruktion 14 ist eine Oberkonstruktion 16 angeordnet, die einen Deckel 46 mit heruntergezogenen Wänden umfasst.

Auf dem Deckel 46 kann eine weitere Heizvorrichtung 48 für die Temperierung der Expositionsvorrichtung 10 vorgesehen sein.

Innerhalb des Deckels 46 ist wenigstens ein Loch 50 vorgesehen, das über einem in der Platte 22 aufgenommenen Kulturgefäß 32 positioniert ist.

In diesem Loch 50 ist ein Strömungseinleitrohr 52 für das gasförmige Medium angeordnet, welches mit einem Ende 54 direkt in das Kulturgefäß 32 ragt, wobei das Ende 54 kurz oberhalb des biologischen Prüfsystems 28 positioniert ist. Das andere Ende 56 des Strömungseinleitrohrs 52 ist außerhalb des Deckels 46 positioniert. Das Strömungseinleitrohr 52 ist außen gegenüber dem Deckel 46 abgedichtet.

Zwischen Platte 22 und Deckel 46 ist um jedes Kulturgefäß 18 eine weitere Dichtung, vorzugsweise in Form eines Dichtrings 58, angeordnet.

Innerhalb des Dichtrings 58 ist im Deckel 46 noch in unmittelbarer Nähe des vorgenannten Lochs 50 eine Austrittsöffnung 60 für das gasförmige Medium angeordnet.

Die Austrittsöffnung 60 ist vorzugsweise mit einer hier nicht dargestellten Vakuumpumpe verbunden, um ein gasförmiges Medium durch das Strömungseinleitrohr 52 auf die Oberfläche des biologischen Prüfsystems 28 und anschließend durch die Austrittsöffnung 60 zu saugen.

Das gasförmige Medium kann bei Anwendung der Expositionsvorrichtung 10 in einem Feldversuch aus der Außenatmosphäre kommen. Somit können beispielsweise die Wirkungen verschiedener natürlich vorkommender Atmosphären auf ein biologisches Prüfsystem 28 untersucht werden.

Es ist natürlich auch möglich, dass zu untersuchende gasförmige Medium durch das Strömungseinleitrohr 52 ohne Vakuumpumpe strömen zu lassen. Dazu ist das Strömungseinleitrohr 55 mit einer hier nicht dargestellten unter Druck stehenden Vorratsflasche verbunden.

Wichtig ist allein, dass zwischen Strömungseinleitrohr 52 und Austrittsöffnung 60 eine Druckdifferenz besteht, so dass das gasförmige Medium kontinuierlich über die Oberfläche des biologischen Prüfsystems 28 und erfindungsgemäß über das Metabolisierungssystem strömen kann.

Die Schlauchpumpe wird über eine hier nicht dargestellte Steuer-/Regelungseinheit bedient, um das biologische Prüfsystem 28 im Kulturgefäß 32 einerseits mit dem Erhaltungsmedium zu versorgen, und erfindungsgemäß andererseits, um den Durchtritt des dem Erhaltungsmedium zugegebenen Metabolisierungssystems durch den permeablen Träger 30 zu ermöglichen, nämlich derart, dass das Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem mittels der Schlauchpumpe auf ein Niveau 40 innerhalb des Hohlraums 24 gepumpt wird, das oberhalb

des Becherbodens 36, also oberhalb der mikroporösen Membran 30, liegt. Der auf das Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem hydrostatisch einwirkende Druck drückt das Metabolisierungssystem nur soweit durch den permeablen Träger 30, dass das biologische Prüfsystem 28 nicht vom Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem überschwemmt wird.

Die Schlauchpumpe ist also nicht nur dazu da, Erhaltungsmedium in den Hohlraum 24 zur Versorgung des biologischen Prüfsystems 28 zu pumpen, sondern sorgt auch dafür, dass das Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem im Hohlraum 24 zwischen Wanne 18 und Platte 22 derart mit Druck beaufschlagt wird, dass das Metabolisierungssystem durch die vorliegend mikroporöse Membran 30 gedrückt werden kann, ohne dass das Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem das biologische Prüfsystem 28 überschwemmt. Eine Submersion des biologischen Prüfsystems 28 ist hier erfindungsgemäß gänzlich unerwünscht.

Um auf zuverlässige Weise zu erreichen, dass das Metabolisierungssystem in unmittelbare Nähe der oder in Kontakt mit dem biologischen Prüfsystem 28 kommt, dieses aber nicht vom Erhaltungsmedium mit Metabolisierungssystem überschwemmt wird, kann es sinnvoll sein, wenigstens einen hier nicht dargestellten Sensor zur Bestimmung des Durchtritts des Erhaltungsmediums mit Metabolisierungssystem durch die mikroporöse Membran 30 zu verwenden, welcher mit der Steuer-/Regeleinheit der Schlauchpumpe verbunden ist und entsprechende Signale an die Steuer-/Regeleinheit zum An-/Ausschalten der Schlauchpumpe gibt.

Es können ferner hier nicht dargestellte Temperatursensoren am oder innerhalb des mit Erhaltungsmedium und Metabolisierungssystem gefüllten Hohlraums 24 vorgesehen sein, und zwar für eine Temperaturregelung des Erhaltungsmediums mit Metabolisierungssystem mittels der zuvor genannten Heizvorrichtungen 20, 48.

Fig. 2 zeigt einen schematischen Aufbau für eine mögliche Untersuchung der Wirkung von n-Butan auf ein biologisches Prüfsystem unter Verwendung eines extrazellulären Metabolisierungssystems.

Für die Untersuchung werden zwei Expositionsrichtungen 62 und 64, vorliegend als Expositionsbox 1 und Expositionsbox 2 bezeichnet, verwendet.

Jede Expositionsrichtung 62, 64 weist neun permeable Träger in Form von mikroporösen Membranen auf. Als biologisches Prüfsystem werden Lungenzellen der Linie V-79 verwendet. Diese wurden zuvor biphasisch, d.h. an der Luft- Flüssigkeitsgrenzschicht, auf den mikroporösen Membranen kultiviert und anschließend in die jeweilige Expositionsrichtung 62, 64, so wie in Fig. 1 dargestellt, eingebracht.

Jede Expositionsrichtung 62, 64 ist mit einem Erhaltungsmedium, nämlich mit einem Kulturmedium befüllt, wobei nur dem Kulturmedium der Expositionsrichtung 64 ein extrazelluläres Metabolisierungssystem, nämlich ein 3% S9-Mix zugesetzt worden ist.

Ein S9-Mix ist dem Fachmann bekannt, wird aber beispielhaft auch bei "D. M. Maron und B. N. Ames, Revised Methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Research, 113 (1983) 173 – 215" beschrieben.

Sowohl das Erhaltungsmedium ohne extrazellulärem Metabolisierungssystem, also ohne S9-Mix, als auch das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem, also mit S9-Mix, stehen gemäß dem erfindungsgemäßen Aufbau mit jeder mikroporösen Membran basal in Kontakt, und werden jeweils durch diese von der Expositionsatmosphäre, die von apikal die mikroporöse Membran erreicht, getrennt.

Das Erhaltungsmedium ohne oder mit extrazellulärem Metabolisierungssystem wird kontinuierlich und reproduzierbar temperiert und wirkt mit einem geeigneten

vorgegebenen Druck von unten auf die mikroporösen Membranen in Abhängigkeit von der vorhandenen/nicht vorhandenen S9-Komponente im Erhaltungsmedium.

In diesen Expositionsvorrichtungen 62, 64 werden die auf den mikroporösen Membranen befindlichen biologischen Prüfsystemen aus dem Zellkulturlabor zu einem laborfernen Expositionsort transportiert.

Dort werden die Expositionsvorrichtungen 62, 64 mit den Zuleitungs- 66 und Ableitungssystemen 68 der Prüf- 70 und Referenzatmosphäre 72 verbunden.

Die Prüfatmosphäre n-Butan 70 ist mit Reinluft oder einem Gemisch aus Stickstoff und Sauerstoff verdünnt. In der Endkonzentration befinden sind 20,5 % Sauerstoff.

Es erfolgt parallel und gleichzeitig eine Exposition gegen eine Reinluft-Kontrolle sowie eine gleichzeitige Exposition von biologischen Prüfsystemen mit und ohne Zumischung von S9-Mix im Kulturmedium.

Die Zuleitung der Prüf- und Referenzatmosphäre 70, 72 zu den biologischen Prüfsystemen wird mit einer Flussrate von 10 ml/min/cm^2 durch Regelung der Flussrate in einem Unterdruck-System konstant über den Expositionszeitraum gewährleistet. Die Prüf- bzw. Referenzatmosphäre 70, 72 wird über den biologischen Prüfsystem, also den Zellrasen, geführt.

Die Expositionszeit beträgt mindestens 3 Stunden.

Anschließend werden die Expositionsvorrichtungen 62, 64 von ihren Zuleitungs- 66 und Ableitungssystemen 68 getrennt und in das Zellkulturlabor zurücktransportiert.

Die mikroporösen Membranen mit ihren biologischen Prüfsystemen werden entnommen.

Es schließt sich die Aufarbeitung der biologischen Prüfsysteme, also der V79-Zellen, an: Analyse der Toxizität mittels Neutralrot-Assay, Untersuchung der Laktat-Dehydrogenase-Freisetzung, Analyse von Apoptose mittels Annexin-V-Assay, Untersuchung von oxidativem Stress mittels Analyse des intrazellulären Glutathion-Status, Untersuchung der Gentoxizität mittels Mikronukleus- und COMET-Assay.

Bezugszeichenliste

(ist Teil der Beschreibung)

10	Expositionsvorrichtung
12	Unterkonstruktion
14	Mittelkonstruktion
16	Oberkonstruktion
18	Wanne
20	Heizvorrichtung
22	Platte
24	Hohlraum
26	Loch
28	biologisches Prüfsystem
30	permeabler Träger
32	Kulturgefäß
34	Becheröffnung
36	Becherboden
38	Dichtung
40	Einlassöffnung
42	Niveau
44	Auslassöffnung
46	Deckel
48	Heizvorrichtung
50	Loch
52	Strömungseinleitrohr
54	Ende
56	Ende
58	Dichtring
60	Austrittsöffnung
62	Expositionsvorrichtung
64	Expositionsvorrichtung
66	Zuleitungssystem

- 68 Ableitungssystem
- 70 Prüfatmosphäre
- 72 Referenzatmosphäre

Patentansprüche

1. Verfahren zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem (28) unter Verwendung eines extrazellulären Metabolisierungssystems, umfassend folgende Verfahrensschritte

- Anzüchtung eines biologischen Prüfsystems (28) auf einem permeablen Träger (30)
- Leiten des gasförmigen Mediums über die Oberfläche des biologischen Prüfsystems (28) zur Bildung einer Expositionsatmosphäre oberhalb des biologischen Prüfsystems (28)
- Zugabe des extrazellulären Metabolisierungssystems zu einem Erhaltungsmedium
- Positionierung des Erhaltungsmediums mit extrazellulärem Metabolisierungssystem unterhalb des permeablen Trägers (30) mit Kontakt zum permeablen Träger (30), derart, dass das extrazelluläre Metabolisierungssystem nur durch den permeablen Träger (30) durchtritt, das biologische Prüfsystem (28) jedoch nicht vom Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem überschwemmt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** folgenden weiteren Verfahrensschritt:

- Regulierung des Durchtritts des dem Erhaltungsmedium zugegebenen extrazellulären Metabolisierungssystems durch den permeablen Träger (30) durch Vorgeben eines bestimmten, auf das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem einwirkenden Drucks.

3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass der auf das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem einwirkende Druck derart gewählt wird, dass das extrazelluläre Metabolisierungssystem durch den permeablen Träger (30) durchtritt, das biologische Prüfsystem (28) jedoch nicht

vom Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem überschwemmt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **gekennzeichnet durch** folgenden weiteren Verfahrensschritt:

- Regulierung der Verdunstungsrate über der Kultur (28) durch Vorgeben einer bestimmten Temperatur im unmittelbaren Umgebungsbereich des biologischen Prüfsystems (28) und/oder Vorgeben einer bestimmten Strömungsgeschwindigkeit des über die Oberfläche des biologischen Prüfsystems (28) strömenden gasförmigen Mediums.

5. Expositionsvorrichtung (10) zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend

- mindestens einen permeablen Träger (30), auf dem ein biologisches Prüfsystem (28) angezüchtet ist,
- mindestens ein Zuleitungssystem (52), über das ein gasförmiges Medium über die Oberfläche des biologischen Prüfsystems (28) zur Bildung einer Expositionsatmosphäre oberhalb des biologischen Prüfsystems (28) leitbar ist
- ein Zuführsystem (24, 40), das ein Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem enthält und derart ausgebildet ist, dass das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem in direktem Kontakt mit der Unterseite des permeablen Trägers (30) steht, wobei
- der permeable Träger (30) derart ausgebildet und innerhalb der Expositionsvorrichtung (10) angeordnet ist, dass dieser (30) das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem physikalisch von der Expositionsatmosphäre trennt, wobei
- das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem mittels eines vorgegebenen Drucks definiert nur durch den permeablen Träger (30) drückbar ist, nämlich derart, dass das Erhaltungsmedium mit extrazellulä-

rem Metabolisierungssystem durch den permeablen Träger (30) durchtritt, das biologische Prüfsystem (28) jedoch nicht vom Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem überschwemmt wird.

6. Expositionsvorrichtung (10) nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Zuführsystem (24, 40) gegenüber dem Zuleitungssystem (50, 52) und der Expositionsatmosphäre abgedichtet ist und lediglich durch den permeablen Träger (30) hindurch das Erhaltungsmedium samt extrazellulärem Metabolisierungssystem mit der Expositionsatmosphäre unter vorgegebenen Bedingungen in Kontakt treten kann.
7. Expositionsvorrichtung (10) nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der vorgegebene Druck hydrostatisch oder mittels wenigstens einer Pumpe oder anderer Druck erzeugender Mittel einstellbar ist.
8. Expositionsvorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 5 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Zuführsystem (24, 40) derart ausgebildet ist, dass das darin enthaltene Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem für die Dauer der Untersuchung im Zuführsystem (24, 40) verbleibt.
9. Expositionsvorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 5 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass der permeable Träger (30) derart ausgebildet ist, dass er einerseits die Aufnahme des biologischen Prüfsystems (28) und andererseits eine Trennung der gasförmigen Phase, also der Expositionsatmosphäre, von der flüssigen Phase, also des Erhaltungsmediums mit extrazellulärem Metabolisierungssystem, ermöglicht.
10. Expositionsvorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 5 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Ableitungssystem (60) vorgesehen ist, über das die Expositionsatmosphäre nach einer vorgegebenen Verweilzeit innerhalb der Expositionsvorrichtung (10) aus dieser (10) ableitbar ist.

11. Expositionsvorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 5 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Zuleitungs- (50, 52) und/oder Ableitungssystem (60) derart ausgebildet sind, dass das gasförmige Medium kontrolliert mittels eines Unterdruck-Systems oder eines Überdruck-Systems durch die Expositionsvorrichtung (10) leitbar ist.
12. Expositionsvorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 5 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Abführsystem (44) vorgesehen ist, über das das Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem nach einer vorgegebenen Verweilzeit innerhalb der Expositionsvorrichtung (10) aus dieser (10) abführbar ist.
13. Expositionsvorrichtung (10) nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Zuführ- (24, 40) und Abführsystem (44) derart ausgebildet ist, dass das darin enthaltene Erhaltungsmedium mit extrazellulärem Metabolisierungssystem in einem kontinuierlichen oder pulsierenden Fluss durch das Zuführ- (24, 40) und Abführsystem (44) geführt wird, wobei zu diesem Zweck vorzugsweise wenigstens eine Pumpe vorgesehen ist.
14. Expositionsvorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 5 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass wenigstens eine Heizvorrichtung (20, 48) vorgesehen ist, durch die die Expositionsvorrichtung (10) ganz oder teilweise temperierbar ist.
15. Expositionsvorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 5 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass das biologische Prüfsystem (28) entweder eine Eukaryonten-Kultur, insbesondere Zelllinien, Primärzellisolate, Gewebeschnitte, rekonstruierte Gewebe wie Kokulturen, oder genetisch veränderte Zellen, oder eine Prokaryonten-Kultur ist.
16. Expositionsvorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 5 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass diese (10) mit einer zellbasierten Sensorik kombiniert ist.

17. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder der Expositionsvorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 5 bis 16 zur Exposition wenigstens eines biologischen Prüfsystems (28) in Zigarettenrauch oder dergleichen oder in Abgasen, vorzugsweise in Automobilabgasen oder in Industrieabgasen.

18. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder der Expositionsvorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 5 bis 16 zur Untersuchung von Umweltatmosphären, Arbeitsplatzatmosphären oder Innenraumatmosphären.

19. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder der Expositionsvorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 5 bis 16 zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem (28) auf dem Gebiet Produktsicherheit, Verbraucherschutz, Pharmaentwicklung, Produktionsüberwachung oder Medizintechnik.

20. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder der Expositionsvorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 5 bis 16 zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem (28) unter Einhaltung regulatorischer Richtlinien, vorzugsweise von OECD-Richtlinien.

21. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder der Expositionsvorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 5 bis 16 zur Untersuchung der Wirkung eines gasförmigen Mediums auf ein biologisches Prüfsystem (28), nämlich zur Untersuchung toxikologischer Effekte, gentoxischer Effekte, immunmodulatorischer oder immuntoxischer Effekte oder anderer biologisch oder toxikologisch relevanter zellulärer Veränderungen.

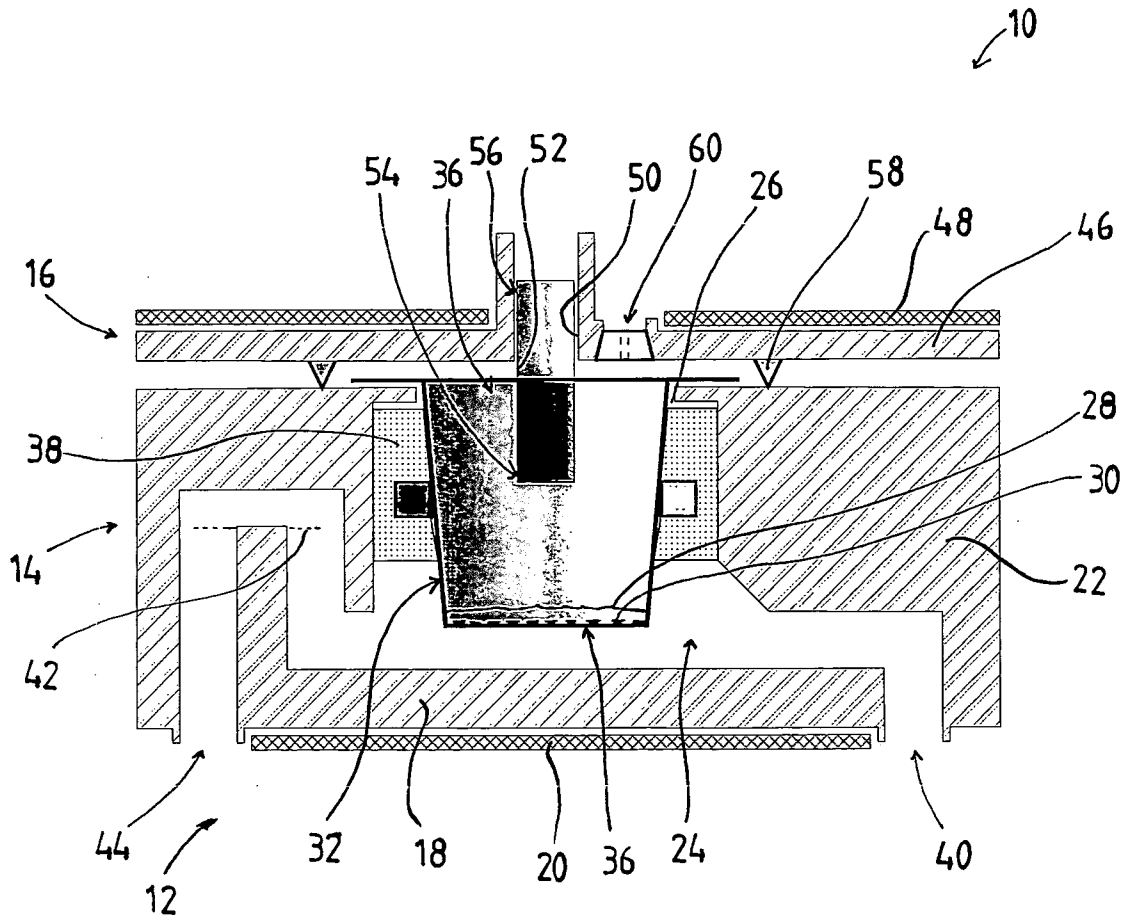


FIG. 1

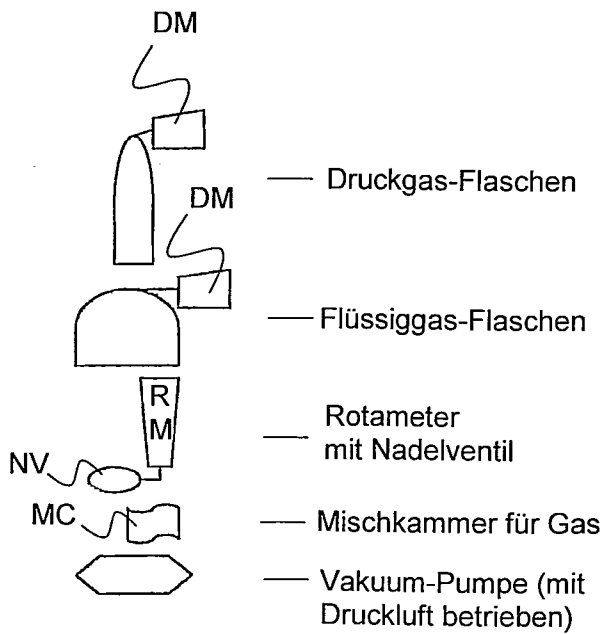
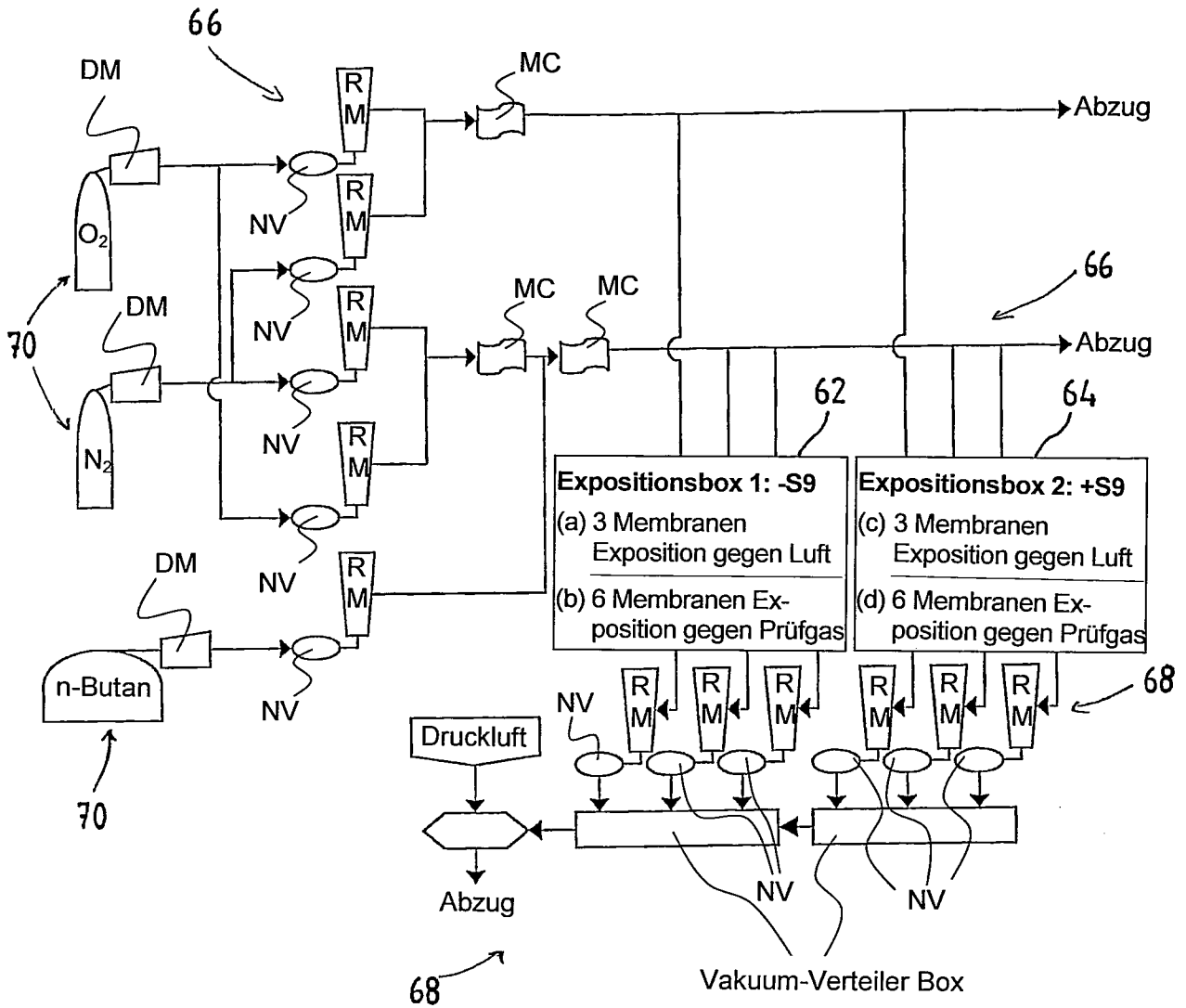


FIG. 2