

# *Abschlussbericht zum Vorhaben*

„FP432“

*Laufzeit*

01.01.2019 – 31.12.2021

Bericht vom 30.04.2022

*Autoren*

Feil G, Hirt B

## Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung deutsch

Kurzfassung englisch

1. Problemstellung

2. Forschungszweck/-ziel

3. Methodik

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

8. Anhang/Anhänge

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

## Kurzfassung deutsch

### Ziele:

Infolge der Neueinstufung von Formaldehyd als krebserzeugender und keimzellmutagener Stoff sowie der Verringerung des Arbeitsplatzgrenzwertes für Formaldehyd entstand insbesondere für das makroanatomische Praktikum in der vorklinischen medizinischen Ausbildung ein nicht unbeachtliches Formaldehyddilemma. Das Hauptziel des Forschungsprojektes bestand in der Durchführung und Evaluation weiterführender Untersuchungen zur sicheren Anwendung des neuen Formaldehyd-Ersatzwirkstoffs Aminolipin zur Fixierung und Konservierung von humanen Ganzkörperpräparaten, Organen und Geweben.

### Aktivitäten/Methoden:

Für eine Bewertung des toxikologischen Profils von Aminolipin für den Mensch wurden zertifizierte Studien nach OECD-Richtlinien u.a. zur Hautkorrosion und Hautreizung zur Augenschädigung, zur Hautsensibilisierung, zur akuten Toxizität und zur Karzinogenität sowie zu physikalisch-chemischen Parametern von Aminolipin durchgeführt. Die Wirksamkeit von Aminolipin-Fixierungslösungen gegen Bakterien, Pilze und Viren wurde in zertifizierten Suspensionsversuchen nach DIN EN geprüft. Von mit verschiedenen Aminolipin-haltigen Lösungen intraarteriell fixierten Ganzkörperpräparaten wurden Präparateproben auf putative humanpathogene Erreger zum Nachweis ihrer bioziden Wirkung mikrobiologisch untersucht. Zudem wurde geprüft, inwieweit in der histopathologischen Fixerroutine Formaldehyd durch Aminolipin ersetzt werden kann.

### Ergebnisse:

Die auf der Grundlage der bis jetzt zu Aminolipin vorliegenden Ergebnisse zur Toxikologie und der intrinsischen Eigenschaften vorgenommene Gefährdungsbeurteilung von Aminolipin zeigt eine geringere Gefährdung für die Gesundheit und Sicherheit von Studierenden und des Fachpersonals im Vergleich zu Formaldehyd. Insbesondere ist Aminolipin nicht volatil, nicht hautsensibilisierend und es gibt keine Hinweise auf ein mutagenes und gentoxisches Potenzial. Die bioziden Wirksamkeitsprüfungen ergaben, dass Aminolipin als *bakterizid*, *levurozid* und mit *begrenzt viruzid PLUS*, d.h. viruzide Wirksamkeit gegen alle behüllte Viren und zusätzlich gegen Adeno-, Noro- und Rotaviren, einzustufen ist. Bei den mikrobiologischen Analysen der mit Aminolipin fixierten Ganzkörperpräparate wurden keine für die klinische Diagnostik relevanten Bakterien und Pilze nachgewiesen, und eine bei einem Fäulnisprozess nach wenigen Tagen *post mortem* übliche Erregerausbreitung über Organgrenzen hinaus konnte durch eine Aminolipinfixierung verhindert werden. Die für die Histopathologie untersuchten Aminolipin-Fixierungslösungen zeigten die Eignung als Ersatz für Formaldehyd. Die Daten bilden eine hervorragende Grundlage, um in einem zweiten Schritt kundenspezifische Aminolipinprodukte für die histopathologischen Routine zu entwickeln.

Die bisherigen Untersuchungen des neuen Wirkstoffs Aminolipin belegen nach dem heutigen Stand der Testungen im Vergleich zu Formaldehyd eine deutlich reduzierte Sicherheitsgefährdung des Menschen bei einer gleichzeitig hohen Fixierungsleistung des neu entwickelten Biozids.

## Kurzfassung englisch

### Objectives:

As a consequence of the new classification of formaldehyde as carcinogenic and germ cell mutagenic as well as the reduction of the occupational exposure limit for formaldehyde, a not insignificant formaldehyde dilemma arose, particularly for the macro-anatomical practical course in preclinical medical education. The main goals of the research project were to conduct and evaluate further studies in the safe application of the new formaldehyde substitute Aminolipin for the fixation and preservation of whole human specimen, organs and tissue.

### Activities/Methods:

To evaluate the toxicological profile of Aminolipin for humans, certified studies according to OECD-guidelines were conducted regarding, among others, skin corrosion and skin irritation, eye damage, skin sensitisation, acute toxicity, and carcinogenicity. Additional studies were conducted regarding the physicochemical parameters of Aminolipin. The efficacy of Aminolipin fixing solutions against bacteria, fungi and viruses was tested in certified suspension tests according to DIN EN. Preparation samples from intra-arterially fixed body donors with various solutions containing Aminolipin were microbiologically tested for putative human pathogens to prove their biocidal efficacy. In addition, the extent to which Aminolipin can replace formaldehyde in the histopathological fixation routine was tested.

### Results:

Based on present results on toxicology and intrinsic properties, a possible risk assessment was drawn up, which shows a lower risk for the health and safety of students and professionals compared to formaldehyde. In particular, Aminolipin is non-volatile, not sensitising to the skin and there is no evidence of mutagenic and genotoxic potential. The biocidal efficacy tests revealed that Aminolipin is to be classified as *bactericidal*, *levurocidal* and as *limited virucidal PLUS*, i.e. virucidal efficacy against all enveloped viruses and additionally against adeno-, noro- and rotaviruses. In the microbiological analyses of the body donors fixed with Aminolipin, no bacteria and fungi relevant for clinical diagnostics were detected. Pathogen spread beyond organ boundaries, which normally happens in a putrefaction process after a few days *post mortem*, could be prevented by Aminolipin fixation. The Aminolipin fixation solutions investigated for histopathology showed to be suited as a substitute for formaldehyde. The data constitute an excellent basis for the development of customised Aminolipin products for routine histopathology in a second step.

The so far conducted studies on the new active substance Aminolipin verify a significantly lower safety risk to humans in comparison to formaldehyde; at the same time, the newly developed biocide has a high fixation capacity.

# 1. Problemstellung

## Formaldehyddilemma in der vorklinischen medizinischen Ausbildung

Infolge der Neueinstufung von Formaldehyd als krebserzeugender und keimzellmutagener Stoff sowie der Verringerung des Arbeitsplatzgrenzwertes (AGW) für Formaldehyd entstand insbesondere für das makroanatomische Praktikum in der vorklinischen medizinischen Ausbildung ein nicht unbeachtliches Formaldehyddilemma: Wie Untersuchungen der Unfallversicherungsträger gezeigt haben, wird im makroanatomischen Praktikum der AGW für Formaldehyd oft überschritten, sodass die anatomische Lehre in Gefahr ist. Nach der Gefahrstoffverordnung (GefStoffV)<sup>1</sup> haben rechtsunterworfenen Arbeitgeber die Pflicht zu Schutzmaßnahmen der Beschäftigten (Präparatoren/innen, Dozenten/innen) und anderer Personen (Studierende, Ärzte/innen).

Vor dem Hintergrund der bestehenden Formaldehydproblematik veranstaltete die Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV) bereits im Oktober 2016 das Fachgespräch zur „Reduzierung der Formaldehydbelastung im anatomischen Praktikum – Lösungsansätze“<sup>2</sup>. Als Maßnahmen zur Absenkung der Formaldehydbelastung unter den Arbeitsplatzgrenzwert wurden neben einer Substitution oder zumindest Reduktion des Formaldehydeinsatzes und einer Verkürzung der Expositionszeiten insbesondere technische Lösungsansätze mittels eines lufttechnisch aktiven Präpariertisches inklusive eines Luftführungssystems für Präpariersäle vorgeschlagen und durchgeführt<sup>3, 4</sup>. Die GefStoffV sieht als vorrangig die Substitution eines Gefahrstoffes vor. Nach der Biozidverordnung (EU) 528/2012<sup>5</sup> steht aber kein geeigneter Stoff als Formaldehydersatz zur Verfügung. Aminolipin ist ein Pyrrolidin-Derivat, das von uns als Ersatzstoff für Formaldehyd entwickelt wurde. Aminolipin ist aufgrund der hocheffektiven Hemmung von Enzymen, insbesondere von Proteinasen, und der gleichzeitigen mikrobioziden Wirkung ein idealer Wirkstoff zur formaldehydfreien Fixierung und Konservierung von biologischen Materialien. In ausgiebigen biochemischen, molekularbiologischen und anatomischen Studien konnte unser interdisziplinäres Team aus Ärzten, Chemikern, Biologinnen und Biologen sowie Präparatorinnen und Präparatoren die hervorragende Eignung von Aminolipin für die Fixierung humaner Ganzkörperpräparate, Organe und Gewebe eindeutig belegen.

---

<sup>1</sup> Gefahrstoffverordnung vom 26. November 2010 (BGBl. I S. 1643, 1644), die zuletzt durch Artikel 2 der Verordnung vom 21. Juli 2021 (BGBl. I S. 3115) geändert worden ist. [https://www.gesetze-im-internet.de/gefstoffv\\_2010/GefStoffV.pdf](https://www.gesetze-im-internet.de/gefstoffv_2010/GefStoffV.pdf), 11.04.2022

<sup>2</sup> DGUV Fachgespräch "Reduzierung der Formaldehydbelastung im anatomischen Praktikum – Lösungsansätze". 2016; [https://www.dguv.de/medien/ifa/de/pub/grl/pdf/2016\\_150.pdf](https://www.dguv.de/medien/ifa/de/pub/grl/pdf/2016_150.pdf), 11.04.2022

<sup>3</sup> DGUV Fachgespräch "Reduzierung der Formaldehydbelastung im anatomischen Praktikum – Lösungsansätze". 2016; [https://www.dguv.de/medien/ifa/de/pub/grl/pdf/2016\\_150.pdf](https://www.dguv.de/medien/ifa/de/pub/grl/pdf/2016_150.pdf), 11.04.2022

<sup>4</sup> Peters S: Fachgespräch „Reduzierung der Formaldehydbelastung im anatomischen Praktikum - Lösungsansätze“. Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft 2016; 11/12: 455-6

<sup>5</sup> Dahncke M, Hohenberger L, Klusmann H, Stockmann R, Thiel P, Thullner I: Formaldehyd in der vorklinischen medizinischen Ausbildung (Anatomie). Reduzierung der Formaldehydbelastung im anatomischen Praktikum: Lüftungstechnische Maßnahmen. Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft 2016; 10: 387-97

<sup>6</sup> Verordnung (EU) Nr. 528/2012 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2012 über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten. ABl. EU L 167, 1-123

## Chemikalien für die Fixierung biologischer Präparate

Stoffe, die für die Fixierung und Konservierung von biologischem Material eingesetzt werden, müssen sowohl die Autolyse der Zellen als auch die mikrobielle Zersetzung der Gewebe inhibieren<sup>6</sup>. Hierfür haben sich Formaldehyd-lösungen bewährt, die für die Fixierung von Organen benutzt werden<sup>7</sup>. Häufig verwendete Chemikalien für eine Feuchtfixierung, Konservierung und Lagerung von humanen und tierischen Ganzkörperpräparaten, Organen und Geweben sind Formaldehyd bzw. Formaldehydabspalter, Alkohole (Ethanol, Methanol) und Phenol<sup>8</sup>. Für die Fixierung und Konservierung von Körperpräparaten werden die genannten Substanzen im Allgemeinen in einer Fixierungslösung gemischt und mit Begleitstoffen versehen, um die Festigkeit, die Elastizität, den Feuchtigkeitsgehalt, die Farbe und den Geruch der Gewebe zu modulieren. Diese Fixantien besitzen in der Regel ein sehr hohes Gefährdungspotenzial für den Anwender.

## Formaldehydproblematik bei der Fixierung biologischer Präparate

Das Arbeiten mit Formaldehyd ist mit einem Risiko für die menschliche Gesundheit verbunden<sup>9</sup>. Formaldehyd wurde von der Internationalen Krebsforschungsagentur (International Agency for Research on Cancer, IARC) als krebserzeugend klassifiziert<sup>10</sup>. In der Europäischen Union ist Formaldehyd aufgrund einer Neubewertung seit 1. Januar 2016 rechtsverbindlich in die Gefahrenklassen *Karzinogen/Kategorie 1B* und *Keimzellmutagen/Kategorie 2* eingestuft<sup>11</sup>. Gesetzliche Regelungen in Form von Luftgrenzwerten stellen ein probates Mittel für die Verminderung der Exposition gegenüber krebserzeugenden Mitteln am Arbeitsplatz dar und werden europaweit als vordringlich betrachtet<sup>12</sup>. In Deutschland gilt seit Februar 2015 für die *Maximale Arbeitsplatz-Konzentration* von Formaldehyd der von 0,62 mg/m<sup>3</sup> auf 0,37 mg/m<sup>3</sup> verringerte Grenzwert<sup>13</sup>.

Infolge der Neueinstufung von Formaldehyd als krebserzeugender und keimzellmutagener Stoff sowie der Verringerung des Arbeitsplatzgrenzwertes (AGW) für Formaldehyd entstand für die anatomischen und pathologischen Institute ein nicht unbeachtliches Formaldehyddilemma, insbesondere jedoch für die anatomischen Praktika in der vor-klinischen medizinischen Ausbildung: Wie Untersuchungen der Unfallversicherungsträger gezeigt haben, wird in den anatomischen Praktika der AGW für Formaldehyd häufig überschritten<sup>14</sup>. Als Folge davon wurden von der

---

<sup>6</sup> Grundmann E: Einführung in die Allgemeine Pathologie, Urban & Fischer 2000

<sup>7</sup> Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP: Formaldehyde fixation. J Histochem Cytochem 1985; 845-53

<sup>8</sup> Brenner E: Human body preservation - new and old techniques. J Anat 2014; 224: 316-44

<sup>9</sup> Eickmann U, Thullner I: Berufliche Exposition gegenüber Formaldehyd im Gesundheitsdienst. Umweltmed Forsch Prax 2006; 11(6): 363-8

<sup>10</sup> IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic risks to humans, formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol. Vol. 88. Ed.: International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon 2006

<sup>11</sup> Verordnung (EU) 2015/491 der Kommission vom 23. März 2015 zur Änderung der Verordnung (EU) Nr. 605/2014 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen zwecks Einfügung von Gefahren- und Sicherheitshinweisen in kroatischer Sprache und zwecks Anpassung an den technischen und wissenschaftlichen Fortschritt. ABl. EU L 78, 24. März 2015, 12-13

<sup>12</sup> Niehs E: Europa nimmt krebserzeugende Arbeitsstoffe ins Visier. Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft 2016; 7/8: 265-266

<sup>13</sup> TRGS 900, Technische Regel für Gefahrstoffe 900: Arbeitsplatzgrenzwerte. BArBl Heft 1/2006 S. 41-55, geändert und ergänzt: GMBI 2018 S.542-545 [Nr. 28] (v.07.06.2018); <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRGS/TRGS-900.html>, 25.03.2022

<sup>14</sup> Thullner I, Stockmann R, Hohenberger L: Formaldehyd in der vor-klinisch medizinischen Ausbildung (Anatomie). Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft 2016; 10: 219-228

zuständigen Landesunfallkasse als Aufsichtsbehörde anatomische Kurse geschlossen oder sind von einer Schließung bedroht<sup>15, 16</sup>.

### **Gesetzlich erlaubte Wirkstoffe für die Fixierung von biologischen Präparaten**

Wirkstoffe und Lösungen zur Fixierung und Konservierung sind Biozide und dürfen nur dann in Verkehr gebracht und verwendet werden, wenn sie nach der Europäischen Biozidverordnung zugelassen und in der Produktart 22 „*Flüssigkeiten für Einbalsamierung und Taxidermie*“ gelistet sind<sup>5</sup>. Derzeit sind von der Europäischen Chemikalienagentur ECHA für die Produktart 22 ausschließlich Iod und Polyvinylpyrrolidon-Iod mit einer befristeten Genehmigung bis 31.08.2025 zugelassen<sup>17</sup>. Diese Substanzen können aufgrund der unzureichenden Wirkung bei der Ganzkörper- und Organfixierung in der Anatomie und Pathologie nicht eingesetzt werden. Für eine von der Industrie beantragte Zulassung in der Produktart 22 „*Flüssigkeiten für Einbalsamierung und Taxidermie*“ werden im aktuellen Prüfprogramm der ECHA für sogenannte Altstoffe<sup>18</sup> die Substanzen Formaldehyd, Bronopol und vier Alkyldimethylbenzylammoniumchlorid-Verbindungen (ADBAC) durch die benannten Behörden in Deutschland, Spanien bzw. Italien bewertet. Sie besitzen aber im Vergleich zu Aminolipin erhebliche Nachteile wie eine fehlende Hemmung der Autolyse und oder das von ihnen ausgehende Gefährdungspotenzial. Die genannten Altstoffe dürfen für die Fixierung und Konservierung von biologischen Materialien nur aufgrund von Übergangsregelungen nach Artikel 89 der Biozidverordnung („Altstoffregel“) verwendet werden und sind Kandidaten für die Substitution im Prüfprogramm der ECHA<sup>17, 18</sup>. Die Abschlüsse der Bewertungsprozesse sind offen. Für Formaldehyd wird das Verfahren voraussichtlich 2025/ 2026 abgeschlossen.

Andere in Fixierungs- und Konservierungslösungen verwendete Chemikalien, die eine Teilreduktion von Formaldehyd ermöglichen könnten, sind nicht erlaubt. Zudem sind Alkohole (Ethanol, Methanol) in den verwendeten Konzentrationen häufig unzureichend antimikrobiell oder wie das auch eingesetzte Phenol toxisch<sup>19</sup>. Die als Formaldehyd-Substitut zur Fixierung von Körperpräparaten vorgestellte Chemikalie N-Vinyl-2-pyrrolidon<sup>20</sup> ist als karzinogen der Kategorie 2 eingestuft<sup>21</sup>, d. h. es besteht der begründete Verdacht auf kanzerogenes Potenzial beim Menschen. Dadurch wird N-Vinyl-2-pyrrolidon keine Bedeutung als Wirkstoff in Fixierungslösungen erhalten. Somit stehen

---

<sup>15</sup> Spiegel online: Zu hohe Formalinwerte: Uni Frankfurt stoppt Präparierkurse für Medizinstudenten. 2015; <http://www.spiegel.de/lebenundlernen/uni/uni-frankfurt-praep-kurse-fallen-wegen-zu-hoher-formalinwerte-aus-a-1029569.html>, 25.03.2022

<sup>16</sup> Spiegel online: Medizinstudenten in Bochum haben sich in einem offenen Brief an die Landesregierung beschwert: Sie ärgern sich, weil sie nicht mehr an echten Leichen lernen dürfen. 2016; <http://www.spiegel.de/lebenundlernen/uni/bochum-medizinstudenten-wollen-nicht-auf-leichen-verzichten-a-1099553.html>, 25.03.2022

<sup>17</sup> ECHA - Information on Chemicals - Biocidal Active Substances: <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/biocidal-active-substances>, 06. April 2022

<sup>18</sup> Delegierte Verordnung (EU) Nr. 1062/2014 der Kommission vom 4. August 2014 über das Arbeitsprogramm zur systematischen Prüfung aller in Biozidprodukten enthaltenen alten Wirkstoffe gemäß der Verordnung (EU) Nr. 528/2012 des Europäischen Parlaments und des Rates <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R1062&from=DE>, 06. April 2022

<sup>19</sup> GESTIS-Stoffdatenbank des Instituts für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA): Phenol. 2022q; <https://gestis.dguv.de/data?name=010430>, 25. März 2022

<sup>20</sup> Haizuka Y, Nagase M, Takashino S *et al.*: A new substitute for formalin: Application to embalming cadavers. Clin Anat 2018; 31(1): 90-98

<sup>21</sup> GESTIS-Stoffdatenbank des Instituts für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA): N-Vinyl-2-pyrrolidon. 2022b; <https://gestis.dguv.de/data?name=029790>, 25. März 2022

aktuell keine Stoffe oder Produkte für eine vollständige oder teilweise Substitution von Formaldehyd für die Fixierung und Konservierung von Körperspendern, Organen und Geweben zur Verfügung.

## 2. Forschungszweck/-ziel

Das Ziel des Forschungsprojektes waren Erkenntnisse für die Beurteilung einer sicheren Verwendung des neuen bioziden Wirkstoffs Aminolipin als Substitut für das hochtoxische Formaldehyd zur Fixierung und Konservierung von humanen Ganzkörperpräparaten, Organen und Geweben.

## 3. Methodik

In dem Förderprojekt wurden die folgenden in fünf Arbeitspaketen (AP) definierten Fragestellungen bearbeitet:

- AP 1. Durchführung zertifizierter toxikologischer Prüfungen zur Reizung/ Verätzung der Haut, Augenreizung, Hautsensibilisierung und zur akuten Toxizität von Aminolipin.
- AP 2. Biozide Wirksamkeitsprüfungen von Aminolipin-Fixierungslösungen gegen Bakterien, Pilze und Viren.
- AP 3. Untersuchungen von Präparateproben fixierter Ganzkörperpräparate auf putative humanpathogene Erreger zum Nachweis der bioziden Wirkung verschiedener Aminolipin-haltiger Fixierungslösungen.
- AP 4. Prüfung inwieweit in der pathologischen Fixerroutine Formaldehyd durch Aminolipin ersetzt werden kann.
- AP 5. Validierung von Schutzmaßnahmen für die Anwendung von Aminolipin in Praxistests.

Im Folgenden werden die eingetretenen Änderungen der geplanten und tatsächlichen Arbeits- und Zeitabläufe dargestellt:

Die zertifizierten Studien in AP 1 sind Teil des Gesamtpakets der toxikologischen Prüfungen (Mensch, Umwelt) von Aminolipin nach der Biozidverordnung (EU) 528/2012, das auch die (weit umfänglicheren) Studien im Rahmen des BMBF-Förderprojektes GO-Bio 8: *Aminolipin zur Formaldehyd-freien Fixierung von biologischen Materialien* (Förderkennzeichen 031B0634/ 161B0634) umfasst. Mit den toxikologischen Tests im Rahmen der beiden Förderprojekte wurden nach Durchführung eines gemäß der Förderrichtlinien für das GO-Bio-Projekt vorgeschriebenen europäischen Verfahrens der Dienstleister Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin ITEM, Hannover bzw. dessen Subunternehmer beauftragt. Nach einer anfänglichen Verzögerung bei der Entwicklung der Prüfstrategie (Meilenstein M 1 *Abschluss der Entwicklung einer Prüfstrategie*) wurden die Meilensteine M 2 *Abgeschlossene Testung zur Irritation/ Korrosivität von Haut und Auge* (erreicht in Q3/2020), M 3 *Abgeschlossene Analyse zur Hautsensibilisierung* (erreicht in Q4/2020) und M 4 *Abgeschlossene Untersuchung zur akuten Toxizität oral* (erreicht in Q1/2020) zeitgerecht erreicht.

Die in dem AP 2 vorgesehenen Testverfahren zur viruziden, bakteriziden und levuroziden/ fungiziden Wirksamkeit von im Laufe des Vorhabens entwickelten Aminolipin-Fixierungslösungen konnten planungsgemäß abgeschlossen werden. Die Meilensteine M 5 *Abgeschlossenes Testverfahren zur Viruzidie* (Q1/2021), M 6 *Abgeschlossenes Testverfahren zur Bakterizidie* (Q3/2020) und M 7 *Abgeschlossenes Testverfahren zur Levurozidie/ Fungizidie* (Q3/2020)

wurden zeitgerecht erreicht. Die in AP 2 vorgesehene zertifizierte Wirksamkeitsprüfung von Aminolipin gegen Prionen mittels TSE-Safety-Study (Western-Blot-Analyse) wurde beim einzigen Anbieter Charles River Biopharmaceutical Services GmbH, Erkrath eingestellt und konnte somit nicht durchgeführt werden. Der Meilenstein M 8 *Abschluss der TSE-Safety-Study* wurde somit nicht erreicht. Als Ausgleich wurde ein Projekt zu Corona in das Forschungsvorhaben aufgenommen (siehe unten).

#### *Vorhaben in der Laufzeitverlängerung*

Im November 2020 wurde in Rücksprache mit dem Begleitkreis ein Antrag auf eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung des Forschungsvorhabens bis zum 31. Dezember 2021 eingereicht. Der Antrag wurde im Dezember 2020 formal gebilligt. Die Gründe für den Antrag waren durch die anhaltende Corona-Pandemie eingetretene zeitliche Verzögerungen, insbesondere bei den zusätzlichen Untersuchungen zur bioziden Wirkung von neuentwickelten Aminolipin-Fixierungslösungen (AP 2), sowie die wünschenswerte Verlängerung der ursprünglich geplanten Laufzeit für die mikrobiellen Analysen bei den fixierten Körperspendern (AP 3) und die Verbesserung der bereits entwickelten Prototypen Aminolipin-haltiger Fixierungslösungen für die Histopathologie und molekulare Pathologie (AP 4).

Im verlängerten Projektzeitraum wurden 1) ein quantitativer Suspensionstest nach EN 14476:2013+A2:2019 zur zertifizierten Klassifikation der Wirksamkeit von Aminolipin gegen Viren durchgeführt, 2) die mikrobiellen Analysen von fixierten Körperspendern in der Serie zur Langzeitbeobachtung (AP 3) vorgenommen und abgeschlossen und 3) die bereits entwickelten Prototypen von Aminolipin-haltigen Fixierungslösungen weiterentwickelt und geprüft. Die auch für das erweiterte AP 3 definierten Meilensteine M 9 und M 10 *Abschluss der Evaluation bezüglich einer putativen bakteriellen bzw. fungalen Kontamination fixierter Körpergewebe* wurden mit Abschluss der Auswertung der Ergebnisse der Serie zur Langzeitbeobachtung in Q4 2021 erreicht. In AP 4 wurden die bereits entwickelten Prototypen von Aminolipin-haltigen Fixierungslösungen für die Histopathologie und molekulare Pathologie weiter untersucht. Zum Ende des Förderprojekts wurden die Untersuchungen zur Histopathologie und Immunhistologie (Meilenstein M 11) und die molekularbiologischen Analysen (Meilenstein M 12) für Zellen, Sphären und Organoide erfolgreich abgeschlossen (Proof-of-Principle). Die Aminolipinfixierung von Geweben zur quantitativen Analytik von Nukleinsäuren erwies sich als sehr komplex und muss weiter untersucht werden.

#### *Ergänzendes Projekt zu Corona*

Für die verlängerte Laufzeit des Forschungsvorhabens wurde zum ursprünglich definierten Vorhaben ein ergänzendes Projekt zu Corona konzipiert. Hintergrund ist, dass von Körperspendern, die mit dem Corona-Virus symptomlos infiziert sind, bei der Fixierung von Körperspendern sowie durch Aerosolbildung beim Öffnen des Brustkorbs eine Infektionsgefahr ausgehen kann. Es wurden die folgenden Studien durchgeführt:

- Grundlagenuntersuchungen *in vitro* zur Wirkung von Aminolipin gegen den Corona-Erreger SARS-CoV-2 im Rahmen einer bestehenden Forschungskoooperation mit Prof. Dr. Michael Schindler, Leiter der Forschungssektion Molekulare Virologie am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Universitätsklinikum Tübingen und - zertifizierte Wirksamkeitsprüfung gegen das Surrogatvirus Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA)

am Institut für Hygiene und Mikrobiologie Dr. Brill + Dr. Steinmann, Hamburg für die zertifizierte Einstufung zur Viruzidie von Aminolipin.

Zusätzlich zum geförderten Forschungsvorhaben sind in dem Arbeitspaket AP 5 als freiwillige Leistung des Antragstellers die Praxistests zum Arbeitsschutz *Messungen volatiler Kohlenwasserstoffe* und *Untersuchungen zur Schutzwirkung von Einweghandschuhen* vorgesehen. Für die Praxistests sollen final entwickelte Aminolipin-haltige Anwenderlösungen eingesetzt werden, die nach UN-GHS klassifiziert sind und deren Gefährdungspotenzial bekannt ist. Plangemäß sollten sämtliche für die Klassifikation des Wirkstoffs Aminolipin erforderlichen Daten aus den nach der Teststrategie vorgesehenen toxikologischen Studien (Mensch, Umwelt) im Dezember 2021 vorliegen. Allerdings kam es aufgrund der anhaltenden Corona-Pandemie zu massiven Verzögerungen bei zwei Schlüsselstudien. Die Finalisierung dieser beiden Studien ist für das dritte Quartal 2022 zu erwarten, sodass erst dann der Wirkstoff Aminolipin abschließend nach UN GHS klassifiziert werden kann. Die beiden oben genannten Praxistests zum Arbeitsschutz werden dementsprechend später durchgeführt werden können.

## 4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

### Ergebnisse

Die im Forschungsvorhaben erzielten Ergebnisse werden nachstehend anhand der Arbeitspakete dargestellt:

#### Arbeitspaket AP 1

In dem Arbeitspaket AP 1 wurden zertifizierte Studien zur Irritation/ Korrosivität (AP 1-2, M 2), zur Hautsensibilisierung (AP 1-3, M 3) und zur akuten Toxizität (AP 1-4, M 4) durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war die Gefährdungsbeurteilung bei der Anwendung von Aminolipin-haltigen Lösungen, die für die Fixierung und Konservierung von humanen Körperpräparaten eingesetzt werden sollen, bzw. beim Präparieren im Anatomischen Praktikum und bei chirurgischen Fortbildungskursen. Mit den toxikologischen Untersuchungen wurde das Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin ITEM, Hannover oder dessen Subunternehmer beauftragt. Die Studien wurden nach OECD-Richtlinien durchgeführt. Die Prüfpläne und Prüfberichte zu den einzelnen Studien wurden vor der Finalisierung seitens Fraunhofer-ITEM und des Anatomische Instituts Tübingen in Rücksprache mit dem jeweilige Prüflabor durchgesehen.

Im Rahmen der entwickelten Teststrategie (*Teilarbeitspaket AP 1-1, M 1*) für die zertifizierten Studien zum Wirkstoff Aminolipin wurden die folgenden Ergebnisse erzielt:

#### Teilarbeitspaket AP 1-2: Bestimmung der Hautkorrosion in vitro (OECD 431)

Die Untersuchungen zur Hautkorrosion von Aminolipin wurden an einem 3D-Gewebemodell rekonstruierter humaner Epidermis (EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT), MatTek IVLSL, Bratislava, CZ) gemäß der OECD-Richtlinie Nr. 431 durchgeführt. Geprüft wurden der Feststoff (100 %) und Aminolipin 20 %, 10 %, 5 % und 1 % (w/v) an je zwei Testgeweben. Das Ergebnis der Untersuchungen zur Hautkorrosion von Aminolipin ist in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Gewebeviabilität				
Aminolipin-Konzentration	Expositionsdauer			
	3 Minuten [≥ 50 %]	VK [≤ 30 %]	1 Stunde [≥ 15 %]	VK [≤ 30 %]
100 %	84,7 %	0 - 2 %	20,4 %	2 - 5 %
20 %	66,8 %	1 - 2 %	4,7 %	3 - 11 %
10 %	80,5 %	0 - 2 %	14,7 %	2 - 5 %
5 %	77,6 %	1 - 3 %	15,1 %	2 - 7 %
1 %	102,0 %	8 %	54 %	15 %

**Tabelle 1:** Viabilität in Prozent (mit Angabe des Variationskoeffizienten (VK)) von *EpiDerm*<sup>TM</sup>-Gewebe (n = 2) im Test *In-vitro*-Hautkorrosion nach OECD 431. Geprüft wurden die Rohsubstanz Aminolipin (100 %) und wässrige Lösungen mit 1 % bis 20 % (w/v) Aminolipin. Die Expositionsdauer war jeweils drei Minuten bei Raumtemperatur und eine Stunde bei 37 °C). Ergebnisse, die die Norm nicht erreichten, sind rot markiert.

Nach den Bewertungskriterien der OECD-Richtlinie 431 können die Festsubstanz (100 %) und Aminolipinkonzentrationen bis 5 % (w/v) nach UN GHS als nicht hautkorrosiv und die Aminolipinkonzentrationen ≥ 10 % (w/v) als *Hautkorrosiv Kategorie 1B/1C* klassifiziert werden. Der Gefahrenhinweis für Gesundheitsgefahren ist *H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden*.

#### Teilarbeitspaket AP 1-2: Bestimmung der Hautreizung in vitro (OECD 439)

Die Studie zur Hautreizung von Aminolipin wurde mit einem 3D-Gewebemodell rekonstruierter humaner Epidermis (*EpiDerm*<sup>TM</sup> Skin Irritation Test (SIT), MatTek IVLSL, Bratislava, CZ) nach der OECD-Richtlinie Nr. 439 durchgeführt. Die *In-vitro*-Tests zur Hautreizung an je zwei *EpiDerm*<sup>TM</sup>-Gewebe zeigten für den geprüften Feststoff (100 %) und für die geprüfte wässrige Aminolipinlösung 3 % (w/v) eine mittlere Abnahme der Viabilität der Zellen in den *EpiDerm*<sup>TM</sup>-Gewebe auf 3,5 % und 3,8 % (%SD 0,02) in Bezug auf die Negativkontrolle (100 %). Die Werte liegen unterhalb des Schwellenwerts von ≤ 50 %. Die geprüften Aminolipinkonzentrationen müssen deshalb als hautreizend betrachtet werden.

Das Ergebnis erfordert eine Einstufung und Kennzeichnung nach UN GHS-als *Hautreizend, Kategorie 2*. Die Kategorie 1 ist in beiden Fällen nicht erforderlich, da Aminolipin im *EpiDerm*<sup>TM</sup>-Test zur Hautkorrosion für den Feststoff und für die Aminolipinkonzentrationen 1 % und 5 % (w/v) nicht hautätzend war (siehe oben). Der Gefahrenhinweis für Gesundheitsgefahren ist *H315 Verursacht Hautreizung*.

#### Teilarbeitspaket AP 1-2: Bestimmung der Augenreizung in vitro (OECD 437)

Die Augenreizung von Aminolipin wurde mit dem *BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability)*-Assay nach der OECD-Richtlinie Nr. 437 bestimmt. Es wurden zwei Testserien an je drei Rinderhornhäuten aus frischen Schlachtabfällen durchgeführt. Geprüft wurden wässrige Aminolipinlösungen 3,0 % und 0,5 % bzw. 0,5 %, 0,25 % und 0,1 %, (w/v). Die Prüflösungen ≤ 0,5 % führten zu (geringen) Wirkungen und die 3%ige Lösung zu schweren Schäden an der

bovinen Hornhaut. Der aus den quantitativen Messergebnissen von Veränderungen der Trübung und Durchlässigkeit der Hornhaut errechnete mittlere *In Vitro* Irritancy Score IVIS ist in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Aminolipin-Konzentration	<i>In Vitro</i> Irritancy Score IVIS	Relative Standardabweichung
3,0 %	111,02	0,99 %
0,5 %	57,76	13,27 %
0,5 %	61,11	11,17 %
0,25 %	21,53	3,98 %
0,1 %	4,19	17,54 %

**Tabelle 2:** *In Vitro* Irritancy Score IVIS (mit Angabe der relativen Standardabweichung bei bovinen Hornhäuten (n = 3) im *In-vitro*-BCOP-Assay nach OECD 437. Geprüft wurden wässrige Lösungen mit 0,1 % bis 3,0 % (w/v) Aminolipin.-Die jeweilige Expositionsdauer war 10 Minuten bei 32 ± 1 °C. Im Anschluss und zwei Stunden nach der Inkubation wurden der Trübungs- und Durchlässigkeitswert gemessen und daraus der IVIS berechnet. Für eine Einstufung relevante Ergebnisse sind rot markiert.

Gemäß OECD-Richtlinie Nr. 437 führt ein Stoff mit einem IVIS > 55 zu schweren Augenschäden. Für einen IVIS > 3; ≤ 55 kann keine Vorhersage getroffen werden. Aminolipinlösungen ≥ 0,5 % sind deshalb nach UN GHS mit *Augenschäden, Kategorie 1* einzustufen. Der Gefahrenhinweis für Gesundheitsgefahren ist *H318 Verursacht schwere Augenschäden*.

Teilarbeitspaket AP 1-3 Bestimmung der Hautsensibilisierung mit dem *In-vivo*-Local Lymph Node Assay (OECD 429)

Das allergische Kontaktsensibilisierungspotenzial von Aminolipin wurde mit dem LLNA (*Local-Lymph-Node*)-Assay nach der OECD-Richtlinie Nr. 429 bestimmt. Mit dem Test wird die Sensibilisierung einer Prüfsubstanz durch die Messung von Zerfallsraten radioaktiv markierter Lymphknotenzellen gemessen und daraus der Stimulationsindex (SI) errechnet. Ein Prüfgegenstand wird im LLNA-Test als sensibilisierend angesehen, wenn der SI ≥ 3 ist. Basierend auf den *In-vitro*-Daten zur Korrosion von Aminolipin wurden Dosierungen von 3 %, 0,5 %, und 0,1 % (w/v) in Propylenglykol (PG) topisch auf der Rückseite beider Ohren von je fünf weiblichen Mäusen (CBA/CaOlaHsd) appliziert. In den niedrigen und mittleren Konzentrationen zeigten die Versuchstiere keine sichtbaren klinischen Symptome einer lokalen Reizung oder einer systemischen Toxizität. In der Gruppe mit der höchsten Aminolipin-Dosis 3 % (w/v) wurden Anzeichen für leichte Veränderungen der Fellpflegeaktivität beobachtet und Anzeichen einer lokalen Reizung (Schuppen auf der Ohrhaut) festgestellt. Da die leichten Verhaltensänderungen zur gleichen Zeit wie die Hautreizung auftraten, ist anzunehmen, dass sie eher eine Auswirkung der Hautreizung als einer systemischen Toxizität sind. Für die Aminolipin-Konzentrationen von 0,1 %, 0,5 % und 3 % (w/v) wurden die Stimulationsindizes (SI) von 0,54, 0,96 und 1,38 ermittelt. Für die Positivkontrolle (25 %  $\alpha$ -Hexylzimaldehyd) war der SI 11,11. Der EC<sub>3</sub>-Wert (Konzentration der Prüfsubstanz mit Verdreifachung der Proliferationsrate gegenüber der Kontrolle) konnte nicht berechnet werden, da keine der getesteten Konzentrationen einen SI größer als der Schwellenwert 3 induzierte.

Aminolipin ist somit als nicht hautsensibilisierend zu bewerten. Eine Einstufung und Kennzeichnung nach UN GHS sind nicht erforderlich.

#### Teilarbeitspaket AP 1-4: Bestimmung der akuten oralen Toxizität in der Ratte (OECD 423)

Für die Bewertung der toxischen Eigenschaften von Aminolipin wurde ein akuter oraler Toxizitätstest nach der OECD-Richtlinie Nr. 423 an weiblichen Wistar-Ratten, Stamm Crl:WI(Han) durchgeführt. Die Ratten wurden in zwei Dosis-Untergruppen eingeteilt. Aminolipin wurde den Tieren als Einzeldosis in Wasser über eine Magensonde verabreicht. Gemäß dem Ablaufdiagramm der OECD-Richtlinie 423 erhielt die erste Gruppe als Startdosis 300 mg/kg Körpergewicht Aminolipin (Dosis-Level 1) in zwei um zwei Tage versetzte Stufen mit je drei Tieren. Da sich bei diesen Tieren über die Versuchsdauer von 14 Tagen keine Evidenz für Toxizität zeigte und keine Todesfälle auftraten, wurde drei weiteren Tieren nach dem Ablaufdiagramm gem. der Richtlinie OECD 423 die Maximaldosis 2.000 mg/kg Körpergewicht Aminolipin (Dosis-Level 2) verabreicht. Die Klassifikation der oralen Toxizität nach UN GHS erfolgt anhand des durch die Versuchstiere tolerierten Dosislevels.

Die Untersuchungen zur akuten oralen Toxizität in der Ratte zeigten keine offensichtliche Toxizität und keine Todesfälle für alle sechs Tiere in der Gruppe 1 nach oraler Verabreichung von 300 mg/kg Körpergewicht Aminolipin. In der Gruppe 2 zeigte sich eine offensichtliche Toxizität mit Todesfällen nach oraler Verabreichung der Dosisobergrenze von 2.000 mg/kg Körpergewicht Aminolipin. Die drei Tiere wiesen schnell einen mittel- bis hochgradig verschlechterten Allgemeinzustand auf. Nach ca. vier Stunden waren zwei Tiere verstorben; das dritte Tier musste in moribundem Zustand getötet werden. Die Nekropsiebefunde ergaben eine Füllung von Magen/ Darm mit wässrigem Inhalt; die Magenwand wirkte sehr dünn und durchsichtig.

Aus den Versuchsergebnissen erfolgt die Einstufung nach UN GHS als *Akute orale Toxizität, Kategorie 4* ( $LD_{50} > 300 - 2.000$  mg/kg Körpergewicht). Der Gefahrenhinweis für Gesundheitsgefahren ist *H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken*. Aminolipin hat somit gegenüber Formaldehyd mit der Kategorie 3 ( $LD_{50} > 50 - 300$  mg/kg Körpergewicht) eine geringere akute Toxizität (oral).

#### **Abgeschlossene ergänzende Tests zu dem Arbeitspaket AP 1 außerhalb des Projekts**

Im Zeitraum des Forschungsvorhabens wurden innerhalb des BMBF-Förderprojektes GO-Bio 8: *Aminolipin zur Formaldehyd-freien Fixierung von biologischen Materialien* (Förderkennzeichen 031B0634/ 161B0634) weitere Tests nach der Biozidverordnung (EU) 528/2012 bereits abgeschlossen oder begonnen. Schwerpunkte der Prüfungen sind:

- das toxikologische Wirkungsspektrum von Aminolipin im Hinblick auf Mensch und Tier inklusive Metabolismus,
- ökotoxikologische Untersuchungen und Studien zum Verbleib und Verhalten in der Umwelt von Aminolipin sowie
- physikalische und chemische Eigenschaften von Aminolipin.

#### Toxikologisches Wirkungsspektrum von Aminolipin im Hinblick auf Mensch und Tier inklusive Metabolismus

Da Aminolipin als Ersatzstoff für das Karzinogen Formaldehyd bei der Fixierung und Konservierung von biologischen Materialien erforscht wird, sah die Teststrategie zertifizierte Tests zum Endpunkt Karzinogenität vor. Zur Prüfung

der Mutagenität wurden der *In-vitro*-Säugerzellgenmutationstest (OECD 490) und der Bakterielle Rückmutationstest (OECD 471) sowie die Gentoxizitätsstudie *In-vitro*-Comet-Assay mit Maus-Lymphom-Zellen L5178Y/TK+/- (OECD 489) durchgeführt. Die *In-vitro*-Studien zur Beurteilung der Mutagenität und Gentoxizität ergaben keine Hinweise auf ein mutagenes und keine Hinweise auf ein gentoxisches Potenzial von Aminolipin.

Die *In-vitro*-Untersuchungen zur dermalen Absorption mittels Diffusionszelle (OECD 428) erbrachten für Aminolipin (Verdünnung) den kalkulierten dermalen Absorptionswert 9,9 %. Ein Wert für die dermale Absorption bis 10 % kann als gering bis mäßig bewertet werden.

#### Ökotoxikologische Untersuchungen und Studien zum Verbleib und Verhalten in der Umwelt von Aminolipin

Für die Prüfung der akuten Ökotoxizität wurden Phase-1-Studien zur Wachstumshemmung bei Süßwasseralgen (OECD 201), zur Immobilisierung bei *Daphnia sp.* (OECD 202) und zur akuten Toxizität bei Fischen (OECD 203) durchgeführt. Die ermittelten EC<sub>x</sub>-Werte lagen im Algentest unter dem Schwellenwert 1 mg/L, weshalb Aminolipin als giftig für Algen einzustufen ist (T-Parameter). Mit EC<sub>x</sub>-Werten (weit) über dem Schwellenwert 1 mg/L im akuten Daphnien- und im akuten Fischtest kann Aminolipin für Crustaceen (Daphnie) und Fische als nicht-toxisch klassifiziert werden. In der anschließend durchgeführten Phase-2-Studie zur chronischen Toxizität in einem Reproduktionstest bei *Daphnia magna* wurden über die gesamte Versuchsdauer von 21 Tagen bis einschließlich der Testkonzentration 2,0 mg/ml keine toxischen Wirkungen beobachtet. Dieser Wert entspricht somit der Gesamt-NOEC (No Observed Effect Concentration) für die Hemmung der Reproduktionsrate, die Hemmung der Körperlänge und für die Sterblichkeit.

Der Abbau und das Verhalten von Aminolipin in der Umwelt wurden mit einem Respirationshemmungstest im Belebtschlamm (OECD 209) und der Schätzung des Adsorptionskoeffizienten (K<sub>oc</sub>) an Boden und Klärschlamm mittels HPLC (OECD 121) geprüft. Im Test nach OECD 209 hatte Aminolipin eine klare Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zur Hemmung der Gesamt-, heterotrophen und Nitrifikationsatmungsrate von Belebtschlamm nach einer Inkubationszeit von drei Stunden mit dem LOEC 30 mg/L (Lowest Observed Effect Concentration). Für die Ermittlung der Desorption/ Adsorption von Aminolipin an Boden und an Klärschlamm war die HPLC-Methode nicht anwendbar, weshalb mit einem neuen Ansatz der n-Oktanol/ Wasserverteilungskoeffizient log K<sub>ow</sub> (OECD 123) bestimmt wurde. Der ermittelte, niedrige log K<sub>ow</sub> 1,60 ± 0,01 ist ein wichtiges Argument gegen eine bioakkumulative Eigenschaft von Aminolipin (kein B-Parameter). Auf Basis der Ergebnisse der Studie nach OECD 209 wurde die leichte biologische Abbaubarkeit in einem Kohlendioxid-Entwicklungstest (OECD 301 B) geprüft. Mit dem Test wurde gezeigt, dass Aminolipin leicht biologisch abbaubar (kein P-Parameter) ist mit einer Abbaurrate von 88 % innerhalb des 28-tägigen Expositionszeitraums. Der Grenzwert für die leichte biologische Abbaubarkeit, d. h. eine CO<sub>2</sub>-Bildung von mindestens 60 % des gesamten organischen Kohlenstoffs in einem 10-Tage-Fenster innerhalb des 28-Tage-Testzeitraums wurde erreicht.

Zur Prüfung des abiotischen Abbaus von Aminolipin wurde die Hydrolyse als Funktion des pH-Werts (OECD 111) durchgeführt. Das Hydrolyseverhalten von Aminolipin wurde bei 50 °C bei pH-Werten von 4, 7 und 9 über einen Zeitraum von fünf Tagen untersucht. Aufgrund der nachgewiesenen Stabilität bei pH 5 und der geringen Abbauraten

von etwas mehr als 10 % bei pH 4 und pH 9 kann Aminolipin unter den Testbedingungen als hydrolytisch stabil bewertet werden.

Zusammengefasst zeigen die Untersuchungen für das *PBT*-Assessment, dass Aminolipin als nicht *persistent*, als nicht *bioakkumulativ* und als *toxisch* gegen Algen zu bewerten ist. Die Einstufung nach UN GHS für Aminolipin ist *Akut aquatisch, Kategorie 1A*. Der Gefahrenhinweis für Umweltgefahren ist *H400 Sehr giftig für Wasserorganismen*.

Physikalische und chemische Eigenschaften von Aminolipin

Nach der Europäischen Biozidverordnung sind für die Charakterisierung eines Wirkstoffs die vollständige Angabe der intrinsischen Substanzeigenschaften sowie die Erfassung und Bewertung physikalischer Gefahren erforderlich. Die experimentellen Untersuchungen hierzu wurden nach standardisierten EU- und OECD-Richtlinien durchgeführt. Die untersuchten Parameter und die Ergebnisse zum Wirkstoff Aminolipin und zu dem Referenzprodukt Aminolipin 0,5 % in Wasser (w/v), pH 7 sind nachstehend in der Tabelle 3 und in der Tabelle 4 zusammengefasst.

<b>Wirkstoff</b>	
<b>Parameter</b>	<b>Ergebnis</b>
Testrichtlinie	
<b>pH-Wert</b> CIPAC MT 75.3 Determination of pH Values	<b>Alkalisch</b> pH 9.5
<b>Schmelz-/Gefrierpunkt</b> Regulation (EC) No 440/2008, A.1. Melting/Freezing Temperature	<b>Solide</b> 82.9 °C
<b>Siedepunkt</b> Regulation (EC) No 440/2008 consolidated version, A.2. Boiling Temperature	<b>320.7 °C</b>
<b>Relative Dichte</b> Regulation (EC) No 440/2008, A.3. Relative Density and OECD 109 Density of Liquids and Solids	<b>1.033 g/cm<sup>3</sup></b>
<b>Granulometrie</b> CIPAC MT 187 Particle Size Analysis by Laser Diffraction	< 9.81 µm (10 %), < 60.17 µm (50 %), < 406.87 µm (90 %)
<b>Absorptionsspektrum (UV/VIS)</b> OECD 101 UV-VIS Absorption Spectra	<b>Keine Absorption</b> (190 - 750 nm)
<b>Entflammbarkeit</b> Regulation (EC) No 440/2008, A.10. Flammability (solids)	<b>Kein brennbarer Feststoff</b>
<b>Thermische Stabilität</b> OECD 113 Screening Test for Thermal Stability and Stability in Air	<b>Stabil</b> Endotherme Wirkung (Schmelzen) im T-Bereich von 50 °C - 105 °C; keine exotherme Wirkung bis 400 °C (Prüfendtemperatur)
<b>Dampfdruck</b> Regulation (EC) 440/2008 and 761/2009, A.4. Vapour Pressure: Effusion Method and OECD 104 (2006) Vapour Pressure	<b>Nicht volatil</b> < 1 × 10 <sup>-3</sup> hPa

Fortsetzung Tabelle 3

<b>Wasserlöslichkeit</b> Regulation (EC) 440/2008 and 260/2014, A.6. Water Solubility and OECD 105 (1995) Water Solubility	<b>Löslich</b> $c_s = 33 \text{ mg/L}$ (bei 20 °C)
<b>Dissoziationskonstanten in Wasser</b> Regulation (EC) No 2017/735, A.25. Dissociation Constants in Water and OECD 112 Dissociation Constants in Water	<b>pK<sub>a</sub> = 9.4</b> (bei 24 °C)
<b>Verteilungskoeffizient n-Octanol/Wasser</b> OECD 123: Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method	<b>log P<sub>OW</sub> = 1.60 ± 0.003</b>
<b>Hydrolyse</b> OECD 111 Hydrolysis as a function of pH	<b>Stabil (bei pH 4, 7, 9)</b>

**Tabelle 3:** Physikalische und chemische Eigenschaften des Wirkstoffs Aminolipin.

<b>Referenzprodukt</b>	
<b>Parameter</b>	<b>Ergebnis</b>
Testrichtlinie	
<b>Metallkorrosivität</b> UN Test Method (Transport of Dangerous Goods): Corrosion to Metals C.1 Section 37.4 (2015, 6 <sup>th</sup> rev.)	<b>Nicht korrosiv für Metalle</b>
<b>Viskosität</b> CIPAC Guideline MT 192: Viscosity of Liquids by Rotational Viscometry	<b>Pseudoplastische Flüssigkeit</b> Scherraten 40 s <sup>-1</sup> – 100 s <sup>-1</sup> : 0.19 mPa·s – 0.58 mPa·s (at 20 °C)
<b>Oberflächenspannung</b> Regulation (EC) No 440/2008, A.5. Surface Tension	<b>Oberflächenaktive Substanz</b> Oberflächenspannung $\sigma = 32.6 \text{ mN/m}$

**Tabelle 4:** Physikalische und chemische Eigenschaften des „Dummy-Produkts“ Aminolipin 0,5 % in Wasser (w/v), pH 7.

## Arbeitspaket AP 2

Im Arbeitspaket AP 2 wurde von im Rahmen des BMBF-Förderprojektes GO-Bio 8: *Aminolipin zur Formaldehyd-freien Fixierung von biologischen Materialien* (Förderkennzeichen 031B0634/ 161B0634) definierten Anwenderlösungen zur Fixierung (Injektionslösung) und Konservierung/ Desinfektion (Tuchlösung) die biozide Wirkung gegen relevante Viren (AP 2-1, M 5), Bakterien (AP 2-2, M 6) und Hefen und Pilze (AP 2-3, M 7) untersucht. Zudem wurden in dem für die verlängerte Laufzeit des Forschungsvorhabens konzipierten Corona-Projekt sowohl Grundlagenuntersuchungen zur Wirkung der Substanz Aminolipin gegen den Corona-Erreger SARS-CoV-2 als auch eine zertifizierte Komplettprüfung gemäß EN 14476:2013+A2:2019 zur Auslobung der viruziden Wirksamkeit von Aminolipin durchgeführt. Die zertifizierten Wirksamkeitsprüfungen wurden durch das Institut für Hygiene und Mikrobiologie Dr. Brill und Dr. Steinmann, Hamburg vorgenommen.

### Teilarbeitspaket AP 2-1 Viruzidie

#### - Grundlagenuntersuchungen zur Wirkung von Aminolipin gegen den Corona-Erreger SARS-CoV-2

Die Wirkung von Aminolipin gegen den Corona-Erreger SARS-CoV-2 wurde in Kulturen mit SARS-CoV2.mNG infizierten Caco-2-Zellen geprüft. Caco-2 ist eine Zelllinie immortalisierter humaner kolorektaler Adenokarzinomzellen. Die Expression von mNeonGreen als Reporter gen dient dem Nachweis infizierter Zellen. Der Virusstock wurde mit den Aminolipinkonzentrationen 0,5 % für 60, 15, fünf und eine Minute(n), mit 0,05 % und 0,005 % jeweils für 15 und fünf Minuten Einwirkzeit inkubiert. Als Toxizitätskontrollen dienten Medien mit der Aminolipinkonzentration 0,5 %, die für 15 Minuten inkubiert wurden. Infektionskontrollen waren nicht mit Aminolipin behandelte Viren mit gleicher Inkubationszeit. SARS-CoV-2 wurde durch Aminolipin zeit- und konzentrationsabhängig inaktiviert: Aminolipin 0,5 % inaktivierte hohe Titer SARS-CoV-2 ( $< 1 \times 10^6$ ) nach 60, 15 und fünf Minuten komplett. Die Aminolipinkonzentrationen 0,05 % und 0,005 % waren bei 15 und fünf Minuten aktiv gegen SARS-CoV-2, es zeigte sich aber keine komplette Inaktivierung mit den niederen Konzentrationen.

#### - Wirksamkeitsprüfungen gemäß EN 14476:2013+A2:2019

Geprüft wurden Muster unterschiedlicher Aminolipinkonzentrationen im Bereich von 0,5 % bis 5,0 % auf die Wirksamkeit gegen das *Modifizierte Vacciniavirus Ankara* (MVA). Das Ziel der Prüfung war eine zusammenfassende Stellungnahme zur viruziden Wirksamkeit von Aminolipin gegen behüllten Viren wie beispielsweise Coronaviren. Als Prüfverfahren wurden quantitative Suspensionsversuche zur Bestimmung der viruziden Wirkung gemäß EN 14476:2013+A2:2019 durchgeführt. Die organische Belastung war mit „hoch“ gewählt worden (3 g/L Rinderalbumin, 3 ml/L Schaferythrozyten). Die Einwirkzeiten waren 30, 60 und 120 Minuten. Das *Modifizierte Vacciniavirus Ankara* (MVA) konnte bereits für die niedrigste Prüfkonzentration 0,5 % und mit der geringsten geprüften Einwirkzeit von 30 Minuten hinreichend (Reduktionsfaktor  $\geq 4 \log_{10}$ ) inaktiviert werden. In der zusammenfassenden Stellungnahme des Prüflabors wurde Aminolipin deklariert als „Viruzide Aktivität gegen alle behüllte Viren“ gemäß EN 14476:2013+A2:2019 wie z.B. HBV, HCV, HIV, humane Influenzaviren, Coronaviren wie MERS-CoV, SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 sowie Ebolavirus.

Unter Beachtung von bereits früher durchgeführten Suspensionsversuchen nach EN 14476 mit hinreichender Wirksamkeit von Aminolipinlösungen gegen die unbehüllten Testviren *Adenovirus* Typ 5 (0,5 %, 120 Minuten) und *Murines Norovirus* (MNV) (2 %, 60 Minuten) kann gemäß einer Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission im Verbund für Angewandte Hygiene e.V.<sup>22</sup> der Wirkstoff Aminolipin mit der Wirksamkeitsstufe 2: „Begrenzt viruzid PLUS“ klassifiziert werden, d.h., Aminolipin ist gegen alle behüllten Viren plus Adeno-, Noro- und Rotaviren wirksam.

### Teilarbeitspaket AP 2-2 und AP 2-3 Levurozidie, Fungizidie

Geprüft wurden Fixierungslösungen mit verschiedenen Zusatzstoffen (Fließmittel) in jeweils unterschiedlichen Mischungsverhältnissen auf die Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* (Bakterizide gem. EN 13727:2015) sowie gegen *Candida albicans* (Fungizidie gem. DIN EN

---

<sup>22</sup> Eggers M: Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH: Neuer Wirksamkeitsbereich begrenzt viruzid PLUS –was ist das? Hyg Med 2016; 41 (12): 319-21

13624:2013). Die Tests wurden als quantitative Suspensionsversuche mit hoher organischer Belastung (3 g/L Rinderalbumin, 3 ml/L Schaferythrozyten) durchgeführt. Die Einwirkzeit war 60 Minuten. Die Wirksamkeitsprüfungen zur Bakterizidie der Fixierungslösungen zeigten eine hinreichende Inaktivierung der geprüften vier Testbakterien (Reduktionsfaktor  $\geq 5 \log_{10}$ ). Die Fixierungslösungen ohne Aminolipin (Negativkontrollen) erfüllten die normgerechte bakterizide Aktivität nicht. Die Wirksamkeitsprüfungen zur Fungizidie (EN 13624:2013) wiesen für einige Prüflösungen eine hinreichende Inaktivierung (Reduktionsfaktor  $\geq 4 \log_{10}$ ) auf. Sie konnten jedoch nicht zertifiziert werden, da das aktive Agens Aminolipin durch das im Testansatz verwendete Neutralisierungsmittel nicht hinreichend inaktiviert wurde.

Die definierte Tuchlösung wurde auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit mit dem Keimbelastungstest nach DIN EN ISO 11930:2019<sup>23</sup> geprüft. Testorganismen waren die Bakterien *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* sowie die Hefe *Candida albicans* und der Pilz *Aspergillus brasiliensis*. Untersucht wurden verschiedene relevante Testkonzentration und eine Kontrolle (0 % Aminolipin). Außer den normgemäßen Prüfzeitpunkten Tag 7, Tag 14 und Tag 28 wurde auch der Prüfzeitpunkt Tag 1 evaluiert. Die Testanforderungen nach DIN EN ISO 11930:2019 für den antimikrobiellen Schutz waren für Aminolipinkonzentrationen  $\geq 0,005$  % erfüllt. Die geforderten Reduktionsfaktoren für *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (Reduktionsfaktor  $\geq 3 \log_{10}$  nach sieben Tagen), *Candida albicans* (Reduktionsfaktor  $\geq 1 \log_{10}$  nach sieben Tagen) und für *Aspergillus brasiliensis* (Reduktionsfaktor  $\geq 1 \log_{10}$  nach 28 Tagen) waren für die Bakterien und für die Hefe deutlich höher. Die für alle Keime geforderten Reduktionsfaktoren wurden auch am zusätzlich geprüften Tag 1 mit Aminolipinkonzentrationen  $\geq 0,005$  % erreicht.

Für eine Simulation bei der Anwendung der Tuchlösung bei fixierten Körperspendern wurde der Keimbelastungstest in Anlehnung an die Norm DIN EN ISO 11930:2019 mit hoher organischer Belastung (0,3 % Rinder-Albumin und 0,3 % Schaf-Erythrozyten) durchgeführt. Prüfzeitpunkte waren Tag 1, Tag 3, Tag 7 und Tag 14. Die Testkriterien (s.o.) waren für die geprüften Bakterien (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) und für die Hefe (*Candida albicans*) mit Aminolipinkonzentrationen  $\geq 0,025$  % (w/v) erfüllt. Der Pilz *Aspergillus brasiliensis* zeigte am maximalen Testzeitpunkt (Tag 14) den nach der Norm für Tag 28 geforderten Reduktionsfaktor  $\geq 1 \log_{10}$  für Aminolipinkonzentrationen von  $\geq 0,005$  % (w/v). An Tag 1 wurde auch im Test mit hoher organischer Belastung die für die Bakterien und für die Hefe geforderten Reduktionsfaktoren mit Aminolipinkonzentrationen  $\geq 0,025$  % (w/v) überschritten. Die an Tag 1 gegen *Aspergillus brasiliensis* wirksame Aminolipinkonzentration war  $\geq 0,1$  %.

Zusammengefasst zeigen die zertifizierten Suspensionsversuche zur bioziden Wirkung von Aminolipin-haltigen Lösungen eine Wirksamkeit gegen alle behüllte Viren plus Noro-, Roto- und Adenoviren sowie gegen Bakterien und Hefen. Aminolipin kann im Konservierungsbelastungstest nach DIN EN ISO 11930:2019 als bakterio-, levuro- und fungistatisch eingestuft werden.

---

<sup>23</sup> DIN EN ISO 11930:2019-04 Cosmetics – Microbiology – Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product (ISO 11930:2012, Corrected version 2013-05-01)

### Arbeitspaket AP 3

In dem Arbeitspaket AP 3 wurden systematische Untersuchungen zur bakteriziden (AP 3-1, M 9) und fungiziden (AP 3-2, M 10) Wirkung von Aminolipin an fixierten menschlichen Ganzkörperpräparaten durchgeführt. Dazu wurden in definierten *Post-mortem*-Intervallen Körperflüssigkeiten aus den Präparaten entnommen sowie ortsspezifische Abstriche intraabdominal durchgeführt und die gewonnenen Proben mikrobiell analysiert.

Insgesamt wurden im Laufe der Studie 11 Aminolipin-haltige Fixierlösungen mit variierendem Aminolipingehalt, verschiedenen Fließmitteln und Osmolyten an insgesamt 43 humanen Ganzkörperpräparaten auf ihre bakterizide und fungizide Wirkung getestet. Die Fixierung der Ganzkörperpräparate erfolgte über eine intraarterielle Injektion mit den entsprechenden Fixierlösungen. Unmittelbar danach wurden die Körper ohne eine zusätzliche Flüssigkeitsbenetzung mit Desinfektionsmitteln in einem Präparatesack bei Raumtemperatur (17°C) und kontrollierter Atmosphäre gelagert.

Die Lagerungszeiten und Analysezeitpunkte der Gruppen wurden so gewählt, dass sie die im Institut gängigen Verweil- und Einsatzdauer der Körperspender für die studentische Ausbildung und die ärztlich-klinische Weiterbildung abbilden. Im Rahmen der Analyse der konventionellen Aminolipin-Injektionslösung wurden 43 Körperspender nach dem Lagerungsintervall von 90 Tagen bis 411 Tagen untersucht.

Nach Ablauf der vorgesehenen Lagerungszeiten wurden die fixierten Ganzkörperpräparate eröffnet und nach der Entnahme von definierten Proben mikrobiologisch analysiert. Durch die Variation der Lagerungszeiten sollte der praktische Anwendungsfall im anatomischen Regelbetrieb bestmöglich abgebildet und erfasst werden. Die mikrobiologische Analytik erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Tübingen.

Die systematische Probengewinnung aus den Körperspender mit der anschließenden mikrobiologischen Evaluation wurde standardisiert durchgeführt.

Unter aseptischen Bedingungen, vergleichbar mit den Standards eines konventionellen chirurgischen Eingriffs, erfolgte die Abstrich- und Flüssigkeitsgewinnung der eröffneten Abdominalhöhle aus ihren drei tiefsten Punkten in liegender Lage (Oberbauch links: Morisons-Grube; Oberbauch rechts: Koller-Grube; kleines Becken: *Excavatio rectouterina/vesicalis*) und der Außenwand des querverlaufenden Dickdarmabschnitts (*Colon transversum*). Weiter wurden Abstriche von angrenzenden Körperhöhlen/-regionen wie des Pleuraspalts im Thorax und des Raums zwischen Leber und Zwerchfell (umschrieben durch die *Area nuda*) zur mikrobiologischen Analytik gewonnen. Die Abstriche wurden nach dem Verfahren „mn7“ der *Mikrobiologisch-infektiologischen Qualitätsstandards* (MIQ 7-8) vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Tübingen aufgearbeitet. Die gewählte Methode deckt das Keimspektrum humanpathologischer Bakterien und Pilze bestmöglich ab.

Untersucht wurden Aminolipin-Injektionslösungen mit zwei unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen, die zuvor aus zertifizierten *In-vitro*-Testungen zur Bestimmung der Wirkung von Aminolipin abgeleitet wurden. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Fixierlösungen mit verschiedenen Fließmitteln und Osmolyten versetzt, um die Hygroskopizität und die Haptik der Gewebe zu modulieren.

Zusammenfassend zeigten sämtliche elf getesteten Aminolipin-Fixierlösungen auf makroskopischer und histologischer Ebene bei allen 43 fixierten humanen Ganzkörperpräparaten eine zuverlässige Inaktivierung des Verwesungsprozesses.

Bei 35 von 43 Präparaten in der Abdominalhöhle wurden keine für die klinische Diagnostik relevanten Bakterien detektiert. In acht von 43 Körperspendern wurde im Abdomen die Diagnose „*Clostridium perfringens* und andere anaerobe Sporenbildner“ gestellt.

Bisherige Kenntnisse aus dem durchgeführten Konservierungsbelastungstest nach DIN EN ISO 11930:2019<sup>23</sup> von Aminolipin-haltigen Lösungen zeigten, dass ein Pilzwachstum und ein Wachstum bakterieller Sporen sowie deren vegetativer Form erfolgreich gehemmt werden konnte (vgl. Seite 18). Bei den antibakteriellen Analysen der gewonnenen Proben konnte mit den angewandten Verfahren *ruhenden* und inaktiven Sporen nicht von der vegetativen Form unterschieden werden.

Aus diesem Grund und der regelhaften Abwesenheit anderer Bakterien in unseren Analysen gehen wir davon aus, dass es sich bei den positiven Abstrichen sporenbildender Bakterien höchstwahrscheinlich um die Sporenform handelt. Die sichere Unterscheidung der initialen Bakterienform muss jedoch in Speziallabors getroffen werden und wurde im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt.

In Bezug auf das bakterielle Wirkungsspektrum zeigten die untersuchten Kompositionen der Aminolipin-haltigen Lösungen für die Fixierung der humanen Ganzkörperpräparaten im Vergleich zueinander keine ausschlaggebenden Unterschiede auf.

Im Hinblick auf die Inaktivierung von Hefen (*Candida albicans*) und Pilzen (*Aspergillus brasiliensis*) konnten bei den mikrobiologischen Analysen mit den oben genannten Standards bei keinem der insgesamt 43 analysierten Körperspender in der Abdominalhöhle klinisch relevante Spezies nachgewiesen werden.

Die langanhaltende mikrobiozide Wirksamkeit von Aminolipin wurde eindrucksvoll mit Daten von vier untersuchten Langzeitpräparaten bestätigt. Bei allen vier Präparaten mit einer durchschnittlichen Lagerungszeit von 408 Tagen vor der Probenabnahme ließen sich in der Abdominalhöhle keine Bakterien nachweisen.

In einer weiteren Versuchsserie wurde im Rahmen eines ärztlichen Fortbildungskurses „prothetischer Schultergelenkersatz“ unter Verwendung von drei Aminolipin-fixierten und zwei Ethanol-Glycerin fixierten Präparaten mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden an der Schulter die Haut, das subkutane Fettgewebe und die Muskulatur großräumig eröffnet und der Gelenkkopf des Oberarmknochens (Humerus) entfernt. Nachfolgend wurde temporär ein Schultergelenksimplantat eingebracht und dabei ebenfalls das Schultergelenk großräumig eröffnet. Zu Schulungszwecken wird im Kurs an mehreren Stellen die streng antiseptische Arbeitsweise verlassen, weshalb eine Keimverschleppung in die Gelenkhöhle sehr wahrscheinlich ist.

Nach Ende des Kurses wurden die eröffneten Gelenkhöhlen der drei Körperspender an drei verschiedenen Stellen abgestrichen und mikrobiologisch analysiert. Bei keinen der abgestrichenen Regionen in der Gruppe der Aminolipin-fixierten Körperspender konnten Bakterien und Pilze in der Kultur nachgewiesen werden. Hingegen ließen sich bei den Ethanol-Glycerin-fixierten Körperspendern Bakterien wie *Cutibacterium acnes* und der *Bacillus*-Spezies sowie der Mikropilz *Rhizopus oryzae* detektieren.

Die Ergebnisse legen nahe, dass auch unter stärkerer äußerer Keimeinbringung die bakterizide und fungizide Wirkung von Aminolipin-Injektionslösungen erhalten bleibt. Dies konnte bei der rein Ethanol-Glycerin-basierten Injektionslösung nicht festgestellt werden.

#### **Arbeitspaket AP 4**

In dem Arbeitspaket AP 4 wurde geprüft, inwieweit eine Reduktion bzw. Substitution von Formaldehyd in der pathologischen Fixieroutine von Zellen und Geweben mit Aminolipin möglich ist. Untersucht wurden verschiedene Aminolipin-Anwenderlösungen (Aminolipingehalt, Additive) auf eine Eignung für die klassische Histologie und die Immunhistologie (AP 4-1, M 11) sowie für die molekulare Pathologie (AP 4-2, M 12).

##### Teilarbeitspaket AP 4-1 Klassische Histologie und Immunhistologie

In diesem Teilarbeitspaket wurde zunächst die grundsätzliche Eignung von Aminolipin-haltigen Fixierlösungen für die pathologische und immunhistochemische Fixierung von Zellen und Geweben untersucht. Für die Anwendbarkeit in diesen Gebieten sind neben der bekannten fixierenden Wirkung von Aminolipin durch Hemmung der Autolyse und des Fäulnisprozesses aufgrund bakterieller Zersetzung eine Vielzahl von weiteren Parametern wesentlich.

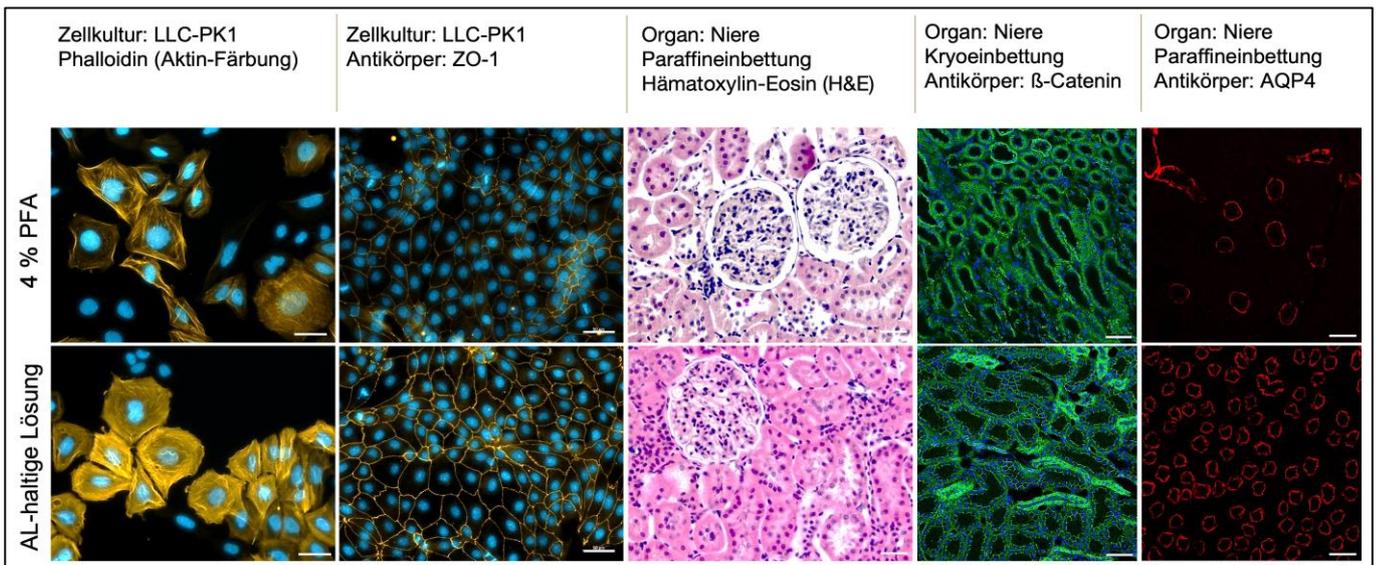
Zur Untersuchung der Eignung von Aminolipin-haltigen Fixierungslösungen mussten vor allen Dingen die einzelnen technischen Schritte nach der Fixierung: die Infiltration des Gewebes mit Paraffin oder TissueTek (Kryofixierung) ohne Schädigung, die Herstellbarkeit von (Ultra-) Dünnschnitten, die Entparaffinierung durch entwässernde Lösungsmittel, sowie die einzelnen Schritte des Färbe- oder immunhistochemischen Protokolls berücksichtigt werden. Dabei wurden besonders die folgenden Aspekte eingehend untersucht und bewertet:

- Gewebeschrumpfung und/oder -schwellung während der einzelnen Arbeitsschritte
- ausreichende Verhinderung von Zell- und Gewebeschäden durch die Aminolipinfixierung während der Infiltration mit heißem Paraffin
- Erhalt der Reaktivität der Zellen und des Gewebes zu Färbemitteln und anderen Reagenzien
- Bewahrung der Antigenität für den Nachweis mit spezifischen Antikörpern
- Notwendigkeit der Antigendemaskierung und Interaktion mit Reagenzien und Schritten von Standardprotokollen und Protokollen zur Antigendemaskierung

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte zwei Aminolipin-Fixierungslösungen entwickelt werden: eine Lösung für die Fixierung von Zellen, Sphären und Organoiden sowie eine Lösung für die Fixierung komplexer Gewebe. Hierfür war es neben der Definition der geeigneten Aminolipin-Konzentration notwendig, mit unterschiedlichen Lösungsmitteln, pH-stabilisierenden Pufferlösungen und osmotisch aktiven Agenzien zu experimentieren und vor allem das Zusammenspiel dieser einzelnen Substanzen mit Aminolipin, den Zellen und unterschiedlichen Geweben sowie dem Färbeprotokoll zu untersuchen.

Die im Rahmen dieses Projekts entwickelten Lösungen fixieren Zellen und Gewebe dauerhaft und in einer herausragenden morphologischen Qualität. Das so fixierte Gewebe kann sowohl Kryo- als auch Paraffin-eingebettet und für alle gängigen histologischen und immunhistologischen Techniken verwendet werden. Für die Zellkultur wurde

ein spezifisches Färbeprotokoll entwickelt, das die Qualität der Aminolipin-Fixierung bezüglich der immunhistologischen Analyse deutlich verbessert. Im Gewebe konnte gezeigt werden, dass alle bislang verwendeten Routineprotokolle sowohl auf Kryo-, als auch auf Paraffinschnitten angewendet werden können. Darüber hinaus konnte die Kompatibilität der Aminolipin-Fixierungslösung mit allen gebräuchlichen Protokollen für die Antigendemaskierung gezeigt werden. Erfreulicherweise sind diese Techniken nach einer Aminolipin-Fixierung im Gegensatz zur vernetzenden Formalin-Fixierung nicht erforderlich. Im Vergleich zu Formaldehyd, alkoholischen Lösungen und den Konkurrenzprodukten zeigen sich die entwickelten Prototypen der Aminolipin-Fixierungslösungen sowohl im Hinblick auf die morphologische als auch auf die immunhistologische Qualität deutlich überlegen (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Vergleich von Aminolipin-haltigen Fixierungslösungen mit 4 %-iger PFA-Fixierungslösung (ROTI®Histo-fix). Die Aminolipin-haltigen Fixierungslösungen bewahren die Zell- und Gewebemorphologie ohne Schrumpfung-artefakte und sind mit gängigen Infiltrations-, Färbe- und Antigendemaskierungsprozessen kompatibel. Hierbei zeigten sich mit der PFA-Fixierung vergleichbare oder bessere Ergebnisse.

Vielversprechend ist, dass die Fixierung auf Aminolipin-Basis die Visualisierung von Formalin-empfindlichen Epitopen wie beispielsweise Vimentin ermöglicht. Auch ist für die Immunfärbung von in Paraffin eingebettetem Gewebe in Abhängigkeit von den Epitopen teilweise keine Antigendemaskierung wie bei Formalin-fixierten Geweben erforderlich. In einem nächsten Schritt müssen für eine vermarktbare Produktreihe für die Aminolipin-Fixierungslösungen Untersuchungen zur Lagerstabilität und zum Erhalt der Reaktivität für unterschiedliche Nukleinsäuren-Sonden durchgeführt werden. Gegebenenfalls müssen die Rezepturen der Aminolipin-Fixierungslösungen entsprechend angepasst werden.

Zusammengefasst zeigen die entwickelten Prototypen der Aminolipin-haltigen Fixierungslösungen für die Fixierung von Zellkulturen und von (histo-)pathologischen Schnitten einen sehr guten Erhalt der Gewebemorphologie und der Zellstrukturen sowie die besondere Eignung für den Nachweis spezifischer Zellepitope. Dadurch ist Aminolipin als sehr vielversprechend für die Substitution von Formaldehyd in der Histopathologie einzuschätzen.

### Teilarbeitspaket AP 4-2 Molekularbiologische Analysen

Für die Weiterentwicklung von Aminolipin-haltigen Fixierungslösungen wurden in der Verlängerungsphase des Projektes die folgenden Experimente durchgeführt:

- Testung der Inaktivierung von RNasen durch mögliche nicht-toxische Zusätze
- Testung der synergistischen Wirkung von Aminolipin und Zusätzen auf die Inaktivierung von RNasen
- Entwicklung neuer Zusammensetzungen für histologische und molekularbiologische Fixierungslösungen
- Testung dieser Fixierungslösungen auf den qualitativen Erhalt der Nukleinsäuren bei Raumtemperatur und bei 4 °C
- Testung dieser Fixierungslösungen auf den Erhalt von Proteinen

Bei der Testung der Inaktivierung von RNasen und DNasen durch Aminolipin zeigte sich, dass erst mit hohen Aminolipin-Konzentrationen diese Enzyme suffizient inaktiviert werden können. In vorhergegangenen Untersuchungen im Teilarbeitspaket AP 4-1 *Klassische Histologie und Immunhistologie* konnten wir allerdings ermitteln, dass sich bei diesen hohen Konzentrationen die Zell- und Gewebemorphologie sowie die Herstellung von Dünnschnitten deutlich verschlechtert. Für die Fixierung von Zellkulturen, Sphären und Organoiden zeigte sich, dass bereits eine geringe Konzentration von Aminolipin ausreicht, um die wenigen unter diesen sterilen Bedingungen vorhandenen RNasen und DNasen zu inaktivieren. Aus diesem Grund wurden die erste Fixierungslösung zum Erhalt der Zellintegrität und Nukleinsäuren in Zellkulturen entwickelt.

Nach der Fixierung von Zellkulturen mit Aminolipin-haltigen Lösungen können aus den Zellen sowohl intakte RNA und DNA als auch Proteine gewonnen werden. Die fixierten Zellen können über einen Zeitraum von bis zu drei Tagen bei Raumtemperatur und bis zu sieben Tagen bei 4 °C gelagert werden und anschließend für komplexe molekulare Analysen wie qPCR und Next-Generation-Sequenzierung (NGS) verwendet werden. Die Qualität und Quantität der aus der Zellkultur gewonnenen RNA nach Aminolipin-Fixierung ist als hervorragend und vergleichbar mit der Alkohol-Fixierung und den kommerziell erhältlichen Produkten zu beurteilen: Die ermittelten RIS-Werte (RNA-Integritätskennzahl auf einer Skala von 1 (vollständig degradierte RNA) bis 10 (komplett intakte RNA)) lagen zwischen 9 und 10. Die Quantität und Qualität der aus Zellen gewonnenen RNA war nach der Aminolipin-Fixierung deutlich besser als die mit den kommerziellen Produkten fixierte RNA. Nach einer Formaldehyd-Fixierung konnte keine integre RNA gewonnen werden und somit keine Qualitätsanalyse durchgeführt werden. Die Qualität der genomischen DNA ist nach Aminolipin-Fixierung der Zellkulturen ebenfalls möglich: In der gelelektrophoretischen Analyse mit dem *Qiaxcel-Kapillar-Gelelektrophorese-System* (Qiagen) konnte keine degradierte oder fragmentierte genomische DNA nachgewiesen werden, während nach einer Formaldehyd-Fixierung die Ausbeute der extrahierten DNA stark reduziert war. Eine käufliche Fixierungslösung zeigte eine deutlich schlechtere Ausbeute der extrahierten DNA. Die Down-Stream-Verwendung der aus Zellkulturen gewonnenen Nukleinsäuren aus Aminolipin-fixierten Zellen wurde ebenfalls untersucht: Sowohl die Ergebnisse der RT-PCR- und qPCR-Analysen als auch die NGS-Analysen zeigten eine herausragende Eignung von Aminolipin-behandelten Nukleinsäuren aus fixierten Zellkulturen.

Die Fixierung von komplexen Geweben und Organen mit Aminolipin-haltiger Fixierungslösung sowohl für die (immun-)histologische als auch für die molekularbiologische Folgeanalytik gestaltete sich als äußerst schwierig und umfangreich. Die für die Inaktivierung von RNasen und DNasen notwendige Aminolipinkonzentration wirkte sich negativ auf die Gewebemorphologie und die Antigenität aus. Aus diesem Grund wurden insgesamt sieben aus der Literatur bekannte RNase-Inhibitoren im Zusammenspiel mit Aminolipin, Puffern und osmotisch aktiven Substanzen getestet. Leider hatten fünf dieser Substanzen in der alleinigen Anwendung ohne Aminolipin keine Wirkung auf diese Enzyme. Auch bei diesen Substanzen waren hohe Konzentrationen notwendig, die sich noch negativer auf die Gewebemorphologie auswirkten als Aminolipin in hoher Konzentration. Im Zusammenspiel mit Aminolipin zeigte sich ebenfalls keine Wirkung auf RNasen oder DNasen und der Erhalt der Gewebemorphologie war ebenfalls nicht zufriedenstellend. Drei dieser Substanzen konnten die Enzyme inaktivieren, allerdings war dieses Gewebe im Anschluss für eine histologische Untersuchung nicht mehr geeignet. Zusammen mit Aminolipin konnte bislang keine Konzentration dieser Substanzen gefunden werden, bei der sowohl die Qualität der Nukleinsäuren als auch die Qualität des Gewebes befriedigend war. Somit konnte bis zum Projektende noch keine Lösung gefunden werden, die diese Anforderungen erfüllt.

#### **Arbeitspaket AP 5**

In dem außerhalb des geförderten Projektes definierten Arbeitspaket AP 5 sind Messungen volatiler Kohlenwasserstoffe in der Raumluft (AP 5-1, M 13) und Untersuchungen zur Schutzwirkung von Einweghandschuhen (AP 5-2, M 14) mit der final entwickelten und nach UN GHS klassifizierten Anwenderlösung zur Fixierung von Ganzkörperpräparaten vorgesehen. Da es durch die Corona-Pandemie zu Verzögerungen beim Abschluss der geplanten toxikologischen Prüfungen kam, konnte die Klassifikation der Anwenderlösung noch nicht abschließend vorgenommen werden. Die beiden Praxistests zum Arbeitsschutz werden dementsprechend erst später durchgeführt werden können.

Bei den bisherigen Messungen volatiler Kohlenwasserstoffe (VOC) bei Ganzkörperpräparaten, die mit Aminolipin-haltigen Lösungen verschiedener Zusammensetzung fixiert wurden, erwies sich Aminolipin als nicht volatil. Die Luftanalysen bei den fixierten Körperpräparaten wurden in der eigens für die Messungen volatiler Kohlenwasserstoffe entwickelten Messkammer HADES (*Hood for Analytic Detection of Emission of Substances*) in Kooperation mit der Ingenieurgesellschaft Müller BBM GmbH, Stuttgart/ Reutlingen und dem Prüfinstitut GfU – Gesellschaft für Umweltchemie mbH, München durchgeführt. Dass Aminolipin nicht volatil ist, wird durch die zertifizierte Messung zum Dampfdruck ( $<1 \times 10^{-3}$  hPa bei 20 °C - 120 °C) mit der Effusionsmethode gemäß den Richtlinien EC No. 440/2008<sup>24</sup> und OECD Nr. 104 (2006)<sup>25</sup> bei der Siemens AG, Prozess-Sicherheit, Frankfurt a.M. bestätigt. Aufgrund dieser Daten, ist davon auszugehen, dass für das Personal bei der Fixierung der Ganzkörperpräparate sowie für die

---

<sup>24</sup> Verordnung (EG) Nr. 440/2008 der Kommission vom 30. Mai 2008 zur Festlegung von Prüfmethode gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH). Amtsblatt der Europäischen Union L 142/1, 31.5.2008

<sup>25</sup> OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Method No. 104, adopted 23 March 2006: „Vapour Pressure“

Studierenden und für die Betreuerinnen und Betreuer am Präpariertisch keine inhalative Belastung durch flüchtiges Aminolipin gegeben ist.

Für die Praxistests sollen final entwickelte Aminolipin-haltige Anwenderlösungen eingesetzt werden, die nach UN-GHS klassifiziert sind und deren Gefährdungspotenzial bekannt ist. Plangemäß sollten sämtliche für die Klassifikation des Wirkstoffs Aminolipin erforderlichen Daten aus den nach der Teststrategie vorgesehenen toxikologischen Studien (Mensch, Umwelt) im Dezember 2021 vorliegen. Allerdings kam es aufgrund der anhaltenden Corona-Pandemie zu massiven Verzögerungen bei zwei Schlüsselstudien. Die Finalisierung dieser Studien ist für das dritte Quartal 2022 zu erwarten, sodass erst dann der Wirkstoff Aminolipin abschließend nach UN GHS klassifiziert werden kann.

## **5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen**

Im aktuellen Prüfprogramm der Europäischen Chemikalienagentur ECHA für sogenannte Altstoffe werden auf Antrag der Industrie die Substanzen Formaldehyd, Bronopol und vier Alkyldimethylbenzylammoniumchlorid (ADBAC)-Verbindungen für die Zulassung als Biozid in der Produktart 22 „*Flüssigkeiten für Einbalsamierung und Taxidermie*“ geprüft. Diese Stoffe sind als Kandidaten für die Substitution im Bewertungsverfahren. Die Abschlüsse der Bewertungsprozesse sind offen. Formaldehyd darf für die Fixierung und Konservierung von biologischen Materialien nur aufgrund von Übergangsregelungen nach Artikel 89 der Biozidverordnung („Altstoffregel“) verwendet werden<sup>17, 18</sup>. Für Formaldehyd wird das Bewertungsverfahren voraussichtlich 2025/ 2026 abgeschlossen. Iod und Polyvinylpyrrolidon-Iod sind als Wirkstoff in der PT22 seit 2019 zugelassen und werden 2025 neu bewertet.

Umfassende Recherchen in einschlägigen Datenbanken ergaben, dass nachstehend beschriebene neue, teilweise patentierte Produkte für die Fixierung und Konservierung von biologischen Materialien (Körperspender, Organe, Gewebe, Zellen) während der Projektlaufzeit auf den Markt gekommen sind. Allerdings handelt es sich bei einigen um Produkte mit reduziertem Formaldehydgehalt, Formaldehydabspalter oder Lösungen mit anderen bedenklichen Inhaltsstoffen (Methanol, Phenol). Keine dieser Wirkstoffe oder Produktformulierungen verfügt über eine Zulassung nach der Europäischen Biozidverordnung oder befindet sich im Zulassungsverfahren. Somit ist deren Nutzung, Herstellung und Vertrieb in Europa gesetzlich nicht erlaubt.

Fix for Life (F4L) Embalming sind Fixierungslösungen für die makroskopische Fixierung von Körperspendern einer niederländischen Ausgründung der Universität Leiden (Fix for life BV). Diese Lösungen finden aufgrund ihres deutlich reduzierten Formaldehydgehalts (4 % bis 6 % in Konzentraten, 0,2 % bis 0,3 % pro kg Körpergewicht in den Anwendungsmischungen) europaweit Anwendung in chirurgischen und klinischen Trainingszentren, die bislang mit Fresh-frozen-Präparaten gearbeitet haben.

Das Fixier-Medium FixSepar® ECO PLUS Histology (FEPH®) ist eine Neuentwicklung, die von der Firma Biosepar GmbH (Simbach am Inn) hergestellt und vertrieben wird. Dieses Fixiermittel enthält ein Depotmittel, Hexamethylentetramin, das mit positiv geladenen Ionen, insbesondere H<sup>+</sup> aus einer Säure, zu Formaldehyd reagiert. Somit handelt es sich um einen Formaldehydabspalter. Die Erfindung ist patentiert<sup>26,27</sup>.

Die ADDAX Biosciences S. R. L., ein Spin-Off der Universität Turin, nutzt Säure-freies Glyoxal (GAF) zur morphologischen und molekularbiologischen Fixierung von Gewebeproben. Die Erfindung ist patentiert<sup>28, 29, 30</sup>. Glyoxal ist ein volatiles und toxisches Aldehyd mit einer mutagenen Wirkung und ist vermutlich kanzerogen.

Das britische Unternehmen RNAssist hat ein universelles Reagenz zur Stabilisierung, Fixierung und Inaktivierung von biologischen Proben für klinische Diagnose- und Forschungsanwendungen entwickelt und patentiert<sup>31</sup>. Das Patent basiert auf der Entdeckung, dass tiefe eutektische Lösungsmittel (deep eutectic solvents, DES) bzw. DES-Gemische durch Modifikation der Wasserstoffbrückenbindungen RNA, DNA, Proteine und Phosphoproteine vor Schäden bei erhöhten Temperaturen schützen, selbst in komplexen flüssigen Biopsien und festen klinischen Proben.

Die Bedeutung für die Entwicklung einer Formaldehyd-freien Fixierungslösung für die pathologische Diagnostik weltweit wird durch eine Studienarbeit von Yahyaei E *et al.*<sup>32</sup> unterstrichen. Im Rahmen dieser Studie wurde an fünf pathologischen Krankenhausabteilungen im Iran die Bestimmung von Formaldehyd mittels VIS-Spektroskopie auf Grundlage der NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) -Methode 3500 durchgeführt. Zur Bewertung der Gesundheitsrisiken von Formaldehyd wurden die Arbeitsbedingungen und die Arbeitsumgebung untersucht und eine semiquantitative Risikobewertung vorgenommen. Die Ergebnisse zeigen, dass das Expositionsniveau aller Probanden über dem Arbeitsplatzgrenzwert für acht Stunden Expositionszeit von Formaldehyd lag. Das ermittelte Krebsrisiko reichte von  $9,52 \times 10^{-5}$  bis  $1,53 \times 10^{-3}$  und lag damit über dem von der Weltgesundheitsorganisation WHO festgelegten akzeptablen Krebsrisikoniveau.

## 6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

Die Ziele des Forschungsprojektes waren Untersuchungen zur sicheren Anwendung des neuen bioziden Wirkstoffs Aminolipin als Substitut für Formaldehyd zur Fixierung und Konservierung von humanen Ganzkörperpräparaten, insbesondere für das makroanatomische Praktikum in der vorklinischen medizinischen Ausbildung, sowie von

---

<sup>26</sup> Szabados A, Gerigk R: Fixative for fixing biological materials. United States Patent No. 7,915,007 B2; 29.03.2011

<sup>27</sup> Szabados A, Gerigk R: Verwendung von Hexamethylentetramin zum Fixieren von biologischen Materialien. Europäische Patentschrift EP 1 895 287 B1; 23.12.2009

<sup>28</sup> Bussolati G: Acid free glyoxal as fixative for histological preparations. United States Patent No. 11,204,305 B2; 21.12.2021

<sup>29</sup> Bussolati G, Bussolati B, Bussolati N: Preservation of nucleic acid sequences by fixing tissues in buffered formalin prepared with acid-deprived formaldehyde. Patent WO 2021122613 A1; 24.06.2021

<sup>30</sup> Bussolati G: Acid free glyoxal as fixative for histological preparations. European Patent EP 3 416 482 B1; 30.12.2020

<sup>31</sup> Goldsborough AS, Bates MR: Sample fixation and stabilization. United States Patent No. 10,539,488 B2; 21.01.2020

<sup>32</sup> Yahyaei E, Majlesi B, Joubani MN, Pourbakhshi Y, Ghiyasi S, Rastani MJ, Heidari M: Occupational Exposure and Risk Assessment of Formaldehyde in the Pathology Departments of Hospitals. Asian Pac J Cancer Prev 2020; 21(5): 1303-9

Organen und Geweben in der Histopathologie. Zusammengefasst belegen die bis jetzt vorliegenden Ergebnisse der Untersuchungen zur Toxikologie, zur mikrobiellen Wirksamkeit *in vitro* und bei fixierten Ganzkörperpräparaten sowie zu den intrinsischen Eigenschaften von Aminolipin eine reduzierte Sicherheitsgefährdung des Menschen im Vergleich zu Formaldehyd.

Die aufgrund der bisherigen Datenlage mögliche Gefährdungsbeurteilung von Aminolipin zeigt, dass für die Verwendung wässriger Aminolipin-Lösungen zur Fixierung von biologischen Materialien (Ganzkörperpräparate, Organe, Gewebe, Zellen) hiervon ausgehenden Gefährdungen für die Gesundheit und Sicherheit bei der Anwendung durch Fachpersonal sehr gut beurteilbar sind. Die Art und Dauer der Exposition unter Berücksichtigung aller Expositionswege wird für Präparatorinnen und Präparatoren, Studierende im makroanatomischen Praktikum (Präparierkurs), für Ärztinnen und Ärzte in der chirurgischen Weiterbildung sowie für in der histopathologischen Fixerroutine Beschäftigte entwickelt. Hieraus werden dann spezifische Sicherheitsmaßnahmen abgeleitet werden.

Insbesondere zeigen die vorliegenden Ergebnisse zur Ausgasung von Aminolipin gegenüber dem volatilen Gefahrstoff Formaldehyd die Möglichkeit auf, dass aufwändige Lüftungstechnische Maßnahmen zum Schutz vor einer inhalativen Exposition nicht erforderlich sind, wenn Aminolipin als Substitut für Formaldehyd in der Medizin und Pathologie eingesetzt wird: Bei den im Vorfeld des Förderprojektes in Kooperation mit der Ingenieurgesellschaft Müller BBM GmbH, Stuttgart/Reutlingen und dem Prüfinstitut GfU – Gesellschaft für Umweltchemie mbH, München durchgeführte Messungen volatiler Kohlenwasserstoffe (VOC) bei Ganzkörperpräparaten, die mit Aminolipin-haltigen Lösungen verschiedener Zusammensetzung fixiert wurden, wurde nachgewiesen, dass Aminolipin nicht ausgast. Die Emissionsraten von Aminolipin bei fixierten Körperpräparaten wurden in der eigens für die Messungen volatiler Kohlenwasserstoffe entwickelten Messkammer HADES (*Hood for Analytic Detection of Emission of Substances*) gemessen. Dass der Wirkstoff Aminolipin in wässrigen Lösungen nicht volatil ist, konnte nun durch die bei der Siemens AG, Prozess-Sicherheit, Frankfurt a.M durchgeführte zertifizierte Messung zum Dampfdruck mit der Effusionsmethode gemäß den Richtlinien EC No. 440/2008<sup>24</sup> und OECD Nr. 104 (2006)<sup>25</sup>. bestätigt werden: Der Dampfdruck lag unterhalb der kritischen Grenze  $1 \times 10^{-3}$  hPa (bei 20 °C - 120 °C), womit Aminolipin als nicht volatil zu bewerten ist. Dieser Befund belegt die Eignung von Aminolipin aufgrund seiner intrinsischen Eigenschaften als Ersatzstoff für Formaldehyd als Agens zur Fixierung und Konservierung von biologischen Materialien.

Die abschließende Bewertung zur sicheren Anwendung von Aminolipin-haltigen Fixierungs- und Konservierungslösungen in den Bereichen Anatomie und Pathologie kann erst nach Vorliegen der noch ausstehenden Untersuchungen zur Toxikologie erfolgen. Die abschließenden Ergebnisse werden für das dritte Quartal 2022 erwartet.

## 7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

### *Umsetzung und Verwertung der Ergebnisse*

Das Biozid-Dossier für das Wirkstoffverfahren Aminolipin nach der Europäischen Biozidverordnung (EU) 528/2012 kann voraussichtlich zu Beginn des Jahres 2023 bei der bewertenden Behörde eingereicht werden. Nach mehreren intensiven Gesprächen wurde das Verfahren von der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) bzw. dem Fachbereich Bundesstelle für Chemikalien (BfC) sowie dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) und

dem Umweltbundesamt (UBA) übernommen. Nach der erfolgreichen Zulassung als aktive biozide-Substanz in der Produktart 22 (PT 22) *Flüssigkeiten für Einbalsamierung und Taxidermie* der Biozidverordnung (EU) 528/2012 ist die Zulassung der ersten dann entwickelten Aminolipin-Produktfamilie für die Verwendung in der Anatomie als Fixierungs- und Konservierungslösung geplant. Nach erfolgreicher Zulassung ist die Vermarktung über das im Rahmen des BMBF-Förderprojektes GO-Bio 8: *Aminolipin zur Formaldehyd-freien Fixierung von biologischen Materialien* (Förderkennzeichen 031B0634/ 161B0634) im März 2021 ausgegründete Start-up LICIT Solutions GmbH, Tübingen vorgesehen. Hierbei soll die bestehende Vernetzung zu den Anatomischen Instituten in Deutschland, Österreich und der Schweiz genutzt werden. Die für den Markteintritt benötigten Produkte können entweder am Institut für Klinische Anatomie Tübingen in kleinem Maßstab hergestellt werden oder im industriellen Maßstab durch bereits vier identifizierte, in Deutschland ansässige Lohnhersteller.

Für die Substitution von Formaldehyd mit Aminolipin in den Bereichen Bestattung/ Einbalsamierung und Histopathologie ist in enger Zusammenarbeit der LICIT GmbH mit dem Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik Tübingen die Entwicklung von Produkten und deren Zulassung in PT 22 *Flüssigkeiten für Einbalsamierung und Taxidermie* vorgesehen. Im Bereich des Bestattungswesens soll bei der Forschung und Entwicklung und für den Vertrieb mit ausgewählten Partnern zusammengearbeitet werden. Die Partner sind noch nicht abschließend definiert. Für die Histopathologie soll der Markteintritt über die Kooperation mit Key-Opinion-Leadern erfolgen, so dass eine Nachfrage von anderen Instituten in den Bereichen Forschung und Diagnostik entsteht. Der reine Vertrieb der Produkte ist mit etablierten Vertriebspartnern geplant, wobei die LICIT Solutions GmbH als Experte fungiert. Welche Partner für den Vertrieb ausgewählt werden, kann heute noch nicht benannt werden.

#### *Publikationen*

Die erzielten Ergebnisse wurden aufgrund patentrechtlicher Vorgaben bislang nicht veröffentlicht.