



Registered Office
Bio Basic Europe S.r.l.
Office: Via Pirella di Ponzio, 10 - 20146 Milano
Phone: +39 02 4115229 - Fax: 02 41174243
info@biobasic.europa.it - www.biobasic.europa.it

Headquarters
Bio Basic LAB
Pavia Toxicology Services - PAV/InLab/WR/12
Via Torricelli, 24 - 27100 Pavia
Phone: +39 030 422687

EUROPEAN UNION
EUROPEAN COMMISSION
CJ - PAV 10/0000152

Valutazione *in vitro* del potenziale pro-sensibilizzante di un dispositivo medico

Linee Guida OECD 442E

In vitro analysis of the pro-sensitising potential of a medical device

OECD Test Guideline 442E

CLARION LIVING SRL

ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S

Protocollo n° / *Report no.* **2018I11V2-1**

Comitato Tecnico Scientifico <i>Scientific Technical Committee</i> Bio Basic Europe S.r.l. Claudio ANGELINETTA, Ornella PASTORIS, Umberto PIANCA Elia REGOLA, Riccardo VICINI	INDICE INDEX
Responsabile Scientifico – Monitor e Controllo Qualità <i>Scientific Person in Charge and Quality Control</i> Dr. Claudio ANGELINETTA Laurea in Chimica (Università degli Studi di Milano); Specializzato in Scienza e Tecnologia Cosmetiche (Università degli Studi di Milano) Direttore Tecnico BIO BASIC EUROPE S.r.l.	Riassunto <i>Abstract</i> pag. 3
Responsabile della Progettazione Bio Basic Lab <i>Project Responsible Bio Basic Lab</i> Dr.ssa Elia REGOLA Laurea in Scienze Biologiche (Università degli Studi di Genova); Dottorato di Ricerca in Medicina e Biologia Sperimentale - indirizzo Biochimica (Università degli Studi di Genova); Specializzata in Microbiologia e Virologia - indirizzo Tecnico (Università degli Studi di Genova)	Introduzione <i>Introduction</i> pag. 4
Responsabile Laboratorio Test in vitro Bio Basic Europe e Responsabile della Relazione <i>In vitro Tests Responsible Bio Basic Europe and Person responsible for the report</i> Dr. Riccardo VICINI Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (Università degli Studi di Pavia); Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche - indirizzo Farmacologia (Università degli Studi di Pavia)	Scopo <i>Aim</i> pag. 6
Sperimentatore Bio Basic Lab <i>Bio Basic Lab Experimenter</i> Dr. Riccardo VICINI Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (Università degli Studi di Pavia); Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche - indirizzo Farmacologia (Università degli Studi di Pavia)	Materiali e metodi <i>Materials and methods</i> pag. 7
	Risultati <i>Results</i> pag. 10
	Conclusioni <i>Conclusions</i> pag. 12
	Bibliografia <i>References</i> pag. 13

Tutti i diritti sono riservati. Trattasi di documento tecnico scientifico protetto da Copyright.
Nessuna parte di esso può essere riprodotta in alcun modo senza la preventiva autorizzazione scritta di Bio Basic Europe S.r.l.
In base alla nostra esperienza si consiglia di verificarne ogni 3 anni l'armonizzazione con eventuali aggiornamenti normativi.

*All rights are reserved, being it a scientific and technical document protected by Copyright.
No part of this document may be reproduced in any form without the prior written authorization of Bio Basic Europe S.r.l.
Based on our experience, we suggest to check every 3 years its compliance with the guidelines in force.*

RIASSUNTO

Il test pro-sensibilizzante è stato eseguito su colture di monociti trattati con una concentrazione del prodotto da testare di cui è stata precedentemente dimostrata la totale assenza di citotossicità. Come controllo positivo è stato utilizzato il 2,4-dinitroclorobenzene (DNCB), una sostanza dalla nota azione sensibilizzante, mentre il controllo negativo è rappresentato da cellule non trattate e mantenute in terreno di coltura. Si è valutata la variazione di espressione di due marker di membrana, CD86 e CD54: un aumento significativo dell'espressione di queste molecole nelle cellule indica l'attivazione di una risposta immunitaria e quindi la potenziale azione sensibilizzante della sostanza in esame.

I risultati ottenuti hanno mostrato che nelle cellule trattate con il campione testato **l'espressione di CD86 e CD54 non varia significativamente rispetto alle cellule non trattate**. La mancanza di co-espressione dei due marker indica che **il prodotto testato non ha attività pro-sensibilizzante**.

ABSTRACT

The pro-sensitising test was performed on cultures of monocytes treated with non cytotoxic concentration of the tested product. As positive control we used 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), a well known sensitizing substance, while the negative control is represented by untreated cells maintained in culture medium. We evaluated the variation in the expression of two membrane marker, CD86 and CD54: a significant increase in the expression of these molecules on cells surface is indicative of the activation of an immune response and therefore the potential sensitizing action of the test substance.

*In the cells treated with the tested sample **we didn't observe a significant change in the expression of CD86 and CD54 compared to not treated cells**. The lack of co-expression of the two markers means that **the tested product has no pro-sensitising activity**.*

INTRODUZIONE

La sensibilizzazione cutanea rappresenta l'endpoint tossicologico associato all'impiego di sostanze chimiche che hanno la capacità intrinseca di causare nell'uomo allergie cutanee che possono sfociare in una patologia chiamata Dermatite Allergica da contatto (ACD), una risposta immunitaria cellulo-mediata di ipersensibilità di tipo ritardato innescata da prodotti chimici a basso peso molecolare chiamati apteni. La determinazione del potenziale sensibilizzante cutaneo è un elemento fondamentale nella valutazione della sicurezza di sostanze chimiche, soprattutto quelle utilizzate nei prodotti destinati ai consumatori (come cosmetici e detergenti) e nell'Unione Europea rappresenta un'informazione standard richiesta dalla legge sui prodotti chimici. Tradizionalmente, la valutazione del rischio associato alla sensibilizzazione cutanea prevedeva l'utilizzo di animali da laboratorio. Oggi però nell'Unione Europea è vietato testare sugli animali prodotti cosmetici o ingredienti in essi contenuti al fine di valutarne la sicurezza. Inoltre è vietato commercializzare prodotti cosmetici testati su animali. A causa di queste nuove leggi e della sempre maggiore sensibilità dell'opinione pubblica circa il benessere degli animali, l'industria cosmetica ha sviluppato test alternativi alla sperimentazione animale per valutare l'efficacia e la tossicità degli ingredienti dei cosmetici e di altri prodotti.

Gli eventi biologici alla base dei processi di sensibilizzazione cutanea sono ben noti: l'attivazione delle cellule dendritiche (CD), con la caratteristica espressione di markers di membrana ed il rilascio di chemochine e citochine, è considerato in questo contesto un evento chiave. Le cellule dendritiche sono in grado di riconoscere e di internalizzare gli antigeni, come le proteine legate agli apteni, di trasportarli lungo il sistema linfatico fino a raggiungere i linfonodi e di presentarli attraverso le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) ai linfociti T naïve per indurre il loro differenziamento e successiva proliferazione in cellule T della memoria. A livello dei linfonodi, le cellule dendritiche vanno incontro a un processo di maturazione caratterizzato da un cambiamento fenotipico e funzionale: perdono la capacità di processare gli antigeni ma acquisiscono quella di presentare l'antigene. Questo processo di maturazione prevede anche la diminuzione dell'attività fagocitaria, l'aumento dell'espressione delle molecole MHC sulla superficie cellulare, un cambiamento nella secrezione di citochine e chemochine, un aumento nell'espressione di diverse molecole stimolatorie (ad esempio CD80, CD86 e CD40) e di molecole che mediano l'adesione intercellulare (come CD54).

Nel test pro-sensibilizzante proposto, viene misurata la variazione nell'espressione dei marcatori di superficie CD86 e CD54 nelle cellule THP-1, una linea di cellule di leucemia monocitica umana utilizzata come modello di cellule dendritiche. Tale espressione viene misurata mediante citofluorimetria di flusso dopo 24 ore di esposizione delle cellule al campione da testare. Una variazione significativa nell'espressione dei due marcatori rispetto alle cellule non trattate indica che il campione testato possiede un potenziale pro-sensibilizzante.

INTRODUCTION

Skin sensitisation is the toxicological endpoint associated with chemicals that have the intrinsic ability to cause skin allergy in humans, resulting in a disease called Allergic Contact Dermatitis (ACD), a cell-mediated delayed-type hypersensitivity immune response induced by low-molecular-weight chemical compounds called haptens. The assessment of the skin sensitisation potential represents an important component in the safety evaluation of substances, especially those used in consumer products - e.g. cosmetics and detergents and represents a standard information requirement of legislation on chemicals in the EU. Traditionally, skin sensitisation hazard assessment has involved the use of laboratory animals. Within the European Union there is a prohibition of testing of cosmetic ingredients for the purposes of safety evaluation and the marketing of cosmetic products tested on animals is prohibited. Because of this regulation, and of the increasing social concern about animal welfare, the cosmetic industry has been developing alternatives to animal experimentation to test the efficacy or toxicity of cosmetic ingredients and other products.

The key biological events underlying the skin sensitisation process are well established: the activation of dendritic cells (DC), typically assessed by expression of cell surface markers, chemokines and cytokines, is considered to be a key event. DC can recognise and internalise antigens such as haptenated proteins, transport them via the lymphatic system to the regional lymph nodes and present them via major histocompatibility complex (MHC) molecules to naïve T lymphocytes to induce differentiation and proliferation of specific memory T-cells. In the lymph nodes, DC undergo a process of maturation characterised by phenotypic and functional changes resulting in the loss of their capability to process antigens and in the acquisition of the functionality of antigen presentation. The maturation process involves the decrease of phagocytic activity, increased expression of MHC molecules on the cell surface, changes in cytokines and chemokines secretion and up-regulation of several co-stimulatory (e.g. CD80, CD86, CD40) and intercellular adhesion molecules (e.g. CD54).

In the pro-sensitising test here proposed, the modulation of the CD86 and CD54 membrane markers in THP-1 cells, a human monocytic leukemia cell line used as a surrogate model for DC, is measured by flow cytometry following 24 hours of exposure to test sample. Significant variations in co-expression of these two markers with respect to not treated cells means that the tested sample has a pro-sensitising potential.

SCOPO

Lo scopo del test è quello di valutare l'assenza di effetti pro-sensibilizzanti da parte di un dispositivo medico. Il test è stato eseguito secondo le linee guida OECD 442E.

AIM

*The aim of the test is to evaluate if the tested medical device does not cause pro-sensitising effects.
The test has been performed according to OECD Test Guidelines 442E.*

MATERIALI E METODI

MATERIALS AND METHODS

Colture cellulari

Il test è stato condotto su monociti umani THP-1, utilizzati come modello di cellule dendritiche. È noto che le cellule THP-1 mostrano un aumento dell'espressione dei marcatori CD86 e/o CD54 quando trattate con prodotti sensibilizzanti. Le cellule THP-1 sono state coltivate in terreno RPMI-1640 supplementato con 10% di siero fetale bovino, 0.05 mM di 2-mercaptoetanolo e 1% di antibiotici e incubate in condizioni di coltura standard (37°C, 5% CO₂). Sono state applicate le buone pratiche per la coltivazione di cellule.

Cell line and culture conditions

The test was carried out on human monocytes THP-1, used as surrogates for dendritic cells. It is known that THP-1 cells show enhanced CD86 and/or CD54 expression when treated with sensitizers. THP-1 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with fetal bovine serum (10%), 2-mercaptoethanol (0.05 mM) and antibiotics (1%). Cells were incubated at standard culture conditions (37°C, 5% CO₂). Good cell culture practices were used.

Campione testato / *Tested sample*

ClarionMask 2 CLG M 1188/15/CLG-32 taglia s

Concentrazione testata / *Tested concentration*

Liquido di estrazione 50% e successive diluizioni 1:2

Extraction fluid 50% and subsequent 1:2 dilutions

Preparazione dei campioni

Il prodotto da testare è stato incubato overnight in terreno di coltura completo; le cellule sono state trattate con il mezzo di macerazione così ottenuto (filtrato con filtri da 0,22 µm) e le successive diluizioni 1:2. Come controllo positivo è stato usato il 2,4-dinitroclorobenzene (DNCB) alla concentrazione di 4 µg/ml.

Samples preparation

The tested product was incubated overnight in complete culture; the cells were treated with the liquid of maceration (filtered through a 0.22 µM) obtained in this way and subsequent dilutions 1:2. As positive control we used 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) at the concentration of 4 µg/ml.

Determinazione preliminare della vitalità cellulare

Il prodotto è stato sottoposto ad uno screening preliminare di citotossicità condotto sulle cellule THP-1 per scegliere la concentrazione non citotossica da utilizzare nel test pro-sensibilizzante. La vitalità cellulare è stata valutata attraverso il test MTS. Il composto tetrazolico MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] viene ridotto dalle cellule in formazano colorato solubile nel terreno di coltura. Questa conversione è causata dal NADPH o dal NADH prodotto dalle deidrogenasi presenti nelle cellule metabolicamente attive. Questi test sono stati condotti dopo un periodo di trattamento di 24 ore aggiungendo una piccola quantità di soluzione MTS direttamente nei pozzetti con le cellule. Al termine del periodo di incubazione (1-4 ore) è stata letta l'assorbanza (densità ottica, OD) a 450 nm utilizzando un lettore di piastre da 96 pozzetti. La quantità di formazano prodotta è direttamente proporzionale al numero di cellule vive presenti in coltura.

Preliminary determination of cell viability

The product underwent a preliminary cytotoxicity screening on the THP-1 cells in order to choose a non-cytotoxic concentration to use in the pro-sensitising assay. The cell viability was evaluated through a MTS test. The MTS tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] is bioreduced by cells into a colored formazan product that is soluble in tissue culture medium. This conversion is presumably accomplished by NADPH or NADH produced by dehydrogenase enzymes in metabolically active cells. The assay was performed after a 24 hours-treatment period by adding a small amount of the MTS solution directly to culture wells, incubating for 1–4 hours and then recording the absorbance (optical density, OD) at 450 nm with a 96-well plate reader. The quantity of formazan product as measured by absorbance at 450 nm is directly proportional to the number of living cells in culture.

Valutazione del potenziale pro-sensibilizzante

Un adeguato numero di cellule THP-1 è stato pre-coltivato per 48 ore, seminato in piastre da 24 pozzetti e trattato per 24 ore con il campione da testare e con il controllo positivo. Cellule non trattate e mantenute in terreno di coltura rappresentano i controlli negativi. Trascorse le 24 ore di esposizione, le cellule sono state trasferite in provette e centrifugate. Il surnatante è stato eliminato e le cellule lavate due volte con 600 µl di buffer FACS (PBS contenente BSA allo 0.1%). Le cellule sono state quindi divise in due aliquote, centrifugate, risospese nella soluzione bloccante (buffer FACS contenente globuline allo 0.01%) ed incubate per 15 minuti a 4°C. Dopo un'ulteriore centrifugazione, le cellule sono state incubate con gli anticorpi coniugati FITC anti-CD86 o anti-CD54 per 30 minuti a 4°C. I livelli di espressione di CD86 e CD54 sono stati analizzati mediante citofluorimetria di flusso.

Evaluation of the pro-sensitising potential

A suitable number of THP-1 cells was pre-cultured for 48 hours, seeded into a 24 well flat-bottom plate and treated for 24 hours with test sample and with the positive control. Not treated cells maintained in culture medium are negative controls. After 24 hours of exposure, cells were transferred into sample tubes and collected by centrifugation, supernatants were discarded and the remaining cells were washed twice with 600 µl of FACS buffer (PBS containing 0.1% BSA). Cells were split in two aliquots, centrifugated and resuspended in blocking solution (FACS buffer containing 0.01% globulin) and incubated at 4°C for 15 min. After centrifugation, cells were stained with FITC-labelled anti-CD86 or anti-CD54 at 4°C for 30 min. The expression levels of CD86 and CD54 were analysed using flow cytometry.

RISULTATI

RESULTS

Interpretazione dei risultati e modello previsionale

L'espressione di CD86 e CD54 è stata analizzata con citometria a flusso. Sulla base dell'intensità media di fluorescenza (MFI), sono stati calcolati i valori di intensità relativa di fluorescenza (RFI) di CD86 e CD54 per le cellule del controllo positivo e per le cellule trattate chimicamente secondo la seguente equazione:

$$RFI = \frac{\text{MFI cellule trattate} - \text{MFI cellule trattate marcate con IgG1}}{\text{MFI cellule di controllo} - \text{MFI cellule di controllo trattate con IgG1}} \cdot 100$$

Per la misura dell'espressione di CD86/CD54, ogni sostanza viene testata in almeno due prove indipendenti per derivare una singola previsione (POSITIVA o NEGATIVA). La previsione è considerata POSITIVA se almeno una delle seguenti condizioni è soddisfatta in 2 di 2 o in almeno 2 di 3 prove indipendenti, altrimenti la previsione è considerata NEGATIVA:

- RFI di CD86 è uguale o superiore al 150% a qualsiasi concentrazione testata (con vitalità cellulare \geq 50%);
- RFI di CD54 è uguale o superiore al 200% a qualsiasi concentrazione testata (con vitalità cellulare \geq 50%)

Interpretation of results and prediction model

The expression of CD86 and CD54 is analysed with flow cytometry. Based on the geometric mean fluorescence intensity (MFI), the relative fluorescence intensity (RFI) of CD86 and CD54 for positive control (CTRL) cells and chemical-treated cells are calculated according to the following equation:

$$RFI = \frac{\text{MFI of chemical-treated cells} - \text{MFI of chemical-treated IgG1 cells}}{\text{MFI of CTRL cells} - \text{MFI of treated IgG1 CTRL cells}} \cdot 100$$

For CD86/CD54 expression measurement, each test chemical is tested in at least two independent runs to derive a single prediction (POSITIVE or NEGATIVE). The prediction is considered POSITIVE if at least one of the following conditions is met in 2 of 2 or in at least 2 of 3 independent runs, otherwise the prediction is considered NEGATIVE:

- *The RFI of CD86 is equal to or greater than 150% at any tested concentration (with cell viability \geq 50%);*
- *The RFI of CD54 is equal to or greater than 200% at any tested concentration (with cell viability \geq 50%).*

Analisi dell'espressione di CD86 e CD54

Evaluation of CD86 and CD54 expression

In tabella sono riportati i valori di RFI calcolati per il controllo positive (DNCB) e le 8 concentrazioni testate del prodotto in esame

The table shows the values for positive control (DNCB) and the 8 concentrations of the tested product

	DNCB	Concentrazione del campione / <i>Sample concentration (%)</i>							
		50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,7813	0,3906
CD86	152,16	111,64	107,33	112,50	103,02	105,60	106,47	101,72	106,03
CD54	204,76	107,14	109,52	111,90	107,94	109,52	112,70	115,87	118,25

I valori di RFI calcolati non superano i limiti previsti dal modello previsionale. Non si osserva quindi co-espressione di CD86/CD54

The calculated RFI values don't exceed the limits of the prediction model. We didn't observe co-expression of CD86/CD54

CONCLUSIONI

Il campione denominato
ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S
non mostra attività pro-sensibilizzante

CONCLUSIONS

The sample called
ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S
has proved not to have pro-sensitising potential



Dr. Claudio Angelinetta
Technical
Scientific
Director
Bio Basic Europe S.p.A. - Milano, Italy

Il presente Rapporto di Prova è firmato digitalmente ai sensi della normativa vigente
This test report is digitally signed according to current legislation

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

Ainscough JS, Frank Gerberick G, Dearman RJ, Kimber I. Danger, intracellular signaling, and the orchestration of dendritic cell function in skin sensitization. *J Immunotoxicol* 2013; 10: 223-34

An S, Kim S, Huh Y, Lee TR, Kim HK, Park KL, Eun HC. Expression of surface markers on the human monocytic leukaemia cell line, THP-1, as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Contact Dermatitis* 2009; 60(4): 185-92

Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol In Vitro* 2006; 20(5): 767-73

Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys* 1983; 303, 474-82

Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 1991; 3, 207-12

Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol* 2012; 13: 114-24

Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ. Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. *Toxicol Sci* 2011; 1: 238-68

Quah BJ, O'Neill HC. Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 643-54

Riss TL, Moravec RA. Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound for MTS for *in vitro* proliferation and chemosensitivity assays. *Mol Biol Cell* 1992 (Suppl.) 3, 184a

Sakaguchi H, Ashikaga T, Miyazawa M, Kosaka N, Ito Y, Yoneyama K, Sono S, Itagaki H, Toyoda H, Suzuki H. The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an *in vitro* skin sensitization test--human cell line activation test (h-CLAT). *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25(2): 109-26

Sakaguchi H, Ashikaga T, Miyazawa M, Yoshida Y, Ito Y, Yoneyama K, Hirota M, Itagaki H, Toyoda H, Suzuki H. Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol In Vitro* 2006; 20(5): 774-84

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; 26: 171-176

Van Helden SF, van Leeuwen FN, Figdor CG. Human and murine model cell lines for dendritic cell biology evaluated. *Immunol Lett* 2008; 117: 191-197

Vicini R, Mazzini G, Angelinetta C, Pintacuda V, Pastoris O. Forward scatter as a sensitive parameter to perform routine analysis of potential sensitizing compounds. XXXIII Conferenza Nazionale di Citometria, Lucca 22-25/09/2015

Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 2009; 64: 1699-714

