

ANALISI *IN VITRO* DEL POTENZIALE PRO-SENSIBILIZZANTE

In Vitro Analysis of the Pro-Sensitising Potential

COMMITTENTE/CUSTOMER	PASINI PIER MAURIZIO SRL Via Flavio Torti, n. 5 15053 CASTELNUOVO SCRIVIA (AL) - Italy
SPONSOR	PASINI PIER MAURIZIO SRL Via Flavio Torti, n. 5 15053 CASTELNUOVO SCRIVIA (AL)
CAMPIONE/SAMPLE	Mascherine riutilizzabili Holly by Pasini Lotto/Batch: n.p.
DATA REPORT/REPORT DATE	06/04/2020
REPORT N.	REL/0802/2020/ALLTOX/ELB

Indice/ Table of contents

1	PARTE PRIMA/PART ONE – INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION	3
1.1	Committente/Customer	3
1.2	Sponsor	3
1.3	Campione Analizzato/Tested Sample	3
1.4	Controlli/ Controls	3
1.5	Test/Assay	3
1.6	Laboratorio incaricato/Entrusted laboratory	4
1.7	Date dello Studio/Study Dates	4
1.8	Ricercatore principale/Main investigator	4
1.9	Direttore dello Studio/ Study Director	4
1.10	Responsabile Assicurazione Qualità / Quality assurance manager	4
2	PARTE SECONDA/PART TWO	5
	PROTOCOLLO SPERIMENTALE/ STUDY DESIGN	5
2.1	Scopo del test/Purpose of the test	5
2.2	Esecuzione del test/Assay procedures	5
2.2.1	Modello cellulare/Cell model	5
2.2.2	Trattamento ed Esposizione/Treatment and Exposure	5
2.2.3	Esecuzione del test di sensibilizzazione/Sensitisation assay execution	6
2.2.4	Espressione dei risultati/ Expression of results	7
2.3	Criteri di accettabilità del metodo/ Acceptance criteria of method	7
2.4	Interpretazione dei risultati/Results interpretation	7
3	PARTE TERZA/PART THREE	9
	RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS	9
3.1	Requisiti di accettabilità del test /Assay validity requirements	9
3.2	Risultati/Results	9
3.3	Conclusioni/Conclusions	10
4	PARTE QUARTA/PART FOUR	11
	Bibliografia/Bibliography	11

ALLEGATO/ ENCLOSURE:

A) MFI CUT OFF VARIABILITÀ INTRA-SAGGIO/ INTRA ASSAY VARIABILITY

Nota/Note:

Il risultato dei test citati nel presente rapporto si riferisce esclusivamente al/ai prodotto/i testato/i e alle particolari condizioni sperimentali impiegate nel test. Il presente rapporto non può essere riprodotto parzialmente senza il consenso preliminare scritto degli sperimentatori.

The results of the test in this report refer only to the tested product/s and to the particular experimental conditions here employed. This report cannot be partially duplicated without the preliminary written approval of the experimenters.

1 PARTE PRIMA/PART ONE – INFORMAZIONI GENERAL/GENERAL INFORMATION

1.1 *Committente/Customer*

PASINI PIER MAURIZIO SRL
Via Flavio Torti, n. 5
15053 CASTELNUOVO SCRIVIA (AL) - Italy

1.2 *Sponsor*

PASINI PIER MAURIZIO SRL
Via Flavio Torti, n. 5
15053 CASTELNUOVO SCRIVIA (AL)

1.3 *Campione Analizzato/Tested Sample*

Campione/Sample	Codice interno/ Internal code	Descrizione/Description
Mascherine riutilizzabili Holly by Pasini Lotto/Batch: n.p.	1180/20-04	mascherine / masks

np=non pervenuto/not identified

1.4 *Controlli/ Controls*

Controlli/Controls	Fornitore/ Supplier	Lotto/Batch
Nichel Solfato Controllo positivo/ Positive control (PC)	SIGMA (72285)	BCB7967V
Terreno di coltura/ Culture medium Controllo negativo/ Negative control (CN)	GIBCO 21870-076	2124905

1.5 *Test/Assay*

- Valutazione preliminare della vitalità cellulare/citotossicità su monociti umani tramite metodica MTT
- Valutazione dello stimolo pro-sensibilizzante su monociti umani tramite FACS.
- Preliminary evaluation of cytotoxicity on human monocytes through MTT assay
- Evaluation of pro-sensitising activity on human monocytes through FACS analysis

1.6 Laboratorio incaricato/Entrusted laboratory

Istituto Scientifico Ospedale San Raffaele, via Olgettina 60
Milano, Laboratorio di immunologia molecolare e cellulare
San Raffaele/ Scientific Institute, via Olgettina 60, Milano
Italy, Cell and molecular Immunology Laboratory

1.7 Date dello Studio/Study Dates

Inizio/Start: 26/03/2020
Fine/End: 03/04/2020

1.8 Ricercatore principale/Main investigator

Dr. Samuele Burastero, Medico chirurgo, Specialista in
Allergologia e Immunologia Clinica/MD, Allergology and
Clinical Immunology Specialist,
Istituto Scientifico Ospedale San Raffaele/ Scientific
Institute San Raffaele Hospital

1.9 Direttore dello Studio/ Study Director

Dr. Elena Bocchietto, Biologa specialista in Biotecnologie/
Biologist, biotechnology specialist.
ABICH S.r.l.

1.10 Responsabile Assicurazione Qualità / Quality assurance manager

Dr. Emanuele Caravati, PhD
ABICH S.r.l.

2 PARTE SECONDA/PART TWO

PROTOCOLLO SPERIMENTALE/ STUDY DESIGN

2.1 Scopo del test/Purpose of the test

Scopo del test è valutare l'assenza di effetti pro-sensibilizzanti da parte di prodotti finiti o materie prime per uso cosmetico o biomedicale.

Il test è stato condotto su una linea cellulare di monociti denominata THP-1, poiché tale tipo cellulare è fortemente coinvolto nelle risposte immunitarie della cute, organo bersaglio tipico dei prodotti topici. Su queste cellule si è valutata la modulazione dell'espressione di due molecole costimolatorie, CD54 (Intercellular Adhesion Molecule) e CD86 (B7.2) utilizzando come controllo positivo il Nichel Solfato, una tipica sostanza sensibilizzante da contatto. Il Nichel è capace di suscitare in vivo reazioni immunitarie di tipo allergizzante (sensibilizzazione da contatto) ed è stato largamente utilizzato in vitro per studiare la modulazione della risposta immune.

L'aumento dell'espressione di queste molecole costimolatorie sul monocita è quindi segno di attivazione di una risposta immunitaria in seguito ad esposizione ad un antigene potenzialmente allergizzante. Funzionalmente, infatti, l'espressione di molecole costimolatorie su questo tipo cellulare corrisponde all'acquisizione di competenza per la presentazione dell'antigene nella tipica sede (la cute nel nostro caso) in cui in vivo si manifesta sensibilizzazione da contatto.

The purpose of the test is to evaluate whether the tested product or raw material does cause pro-sensitising effects on the involved cell model.

In the present study, we used a monocytes cell line, named THP-1, as prototypic blood-derived immunologically active cell. On these cells, we tested the expression of two costimulatory molecules, CD54 (Intercellular Adhesion Molecule) and CD86 (B7.2), using as positive control Nickel sulphate, a well-known contact sensitising agent, both in in vitro and in vivo models.

The increasing level of expression of CD54 and CD86 on monocytes is a signal of activation of the immune response derived from the exposition to a potentially sensitising contact antigen.

Functionally, the expression of co-stimulatory molecules on the dendritic cells means activation of the immunological response in terms of capability to present the antigen in the typical tissues (skin in our case), where, in vivo, the immune protective response is triggered.

2.2 Esecuzione del test/Assay procedures

2.2.1 Modello cellulare/Cell model

È stata utilizzata una linea monocitoide umana, denominata THP-1. Le cellule sono coltivate in RPMI contenente 10% FCS e 2 mM di glutamina.

The test is carried out on a monocyte-like human line called THP-1. Cells are kept in RPMI containing 10% FCS and 2 mM glutamine.

2.2.2 Trattamento ed Esposizione/Treatment and Exposure

Il campione è stato eluito in tampone fosfato (1g/5ml) per 24 ore a 37°C. L'eluato così ottenuto è stato diluito direttamente nel medium di coltura delle cellule a diverse concentrazioni e sottoposto a test preliminare di citotossicità su cellule THP-1 per valutare a quale concentrazione poteva essere impiegato in vitro senza causare mortalità cellulare, evento che provoca alterazione dei risultati. Come controllo negativo è stato considerato il terreno di crescita delle cellule lasciato nelle stesse condizioni sperimentali.

A seguito dei risultati del test preliminare, l'eluato del campione è stato impiegato a due diverse diluizioni finali sulle cellule THP-1, diluendolo direttamente nel medium di coltura delle cellule in modo da ottenere le concentrazioni finali desiderate a contatto con le cellule. Le cellule sono state esposte per 24 h a 37°C con il 5% di CO₂.

The sample has been eluted in phosphate buffer (1g/5ml) for 24 hours at 37°C. The eluted sample was diluted in the cell culture medium at different concentrations for the preliminary cytotoxicity screening on the cells aimed to decide the best concentration to test it without cytotoxic effects on the monocytes, in order to avoid false results. Cell medium exposed to the same experimental conditions were used as a negative control.

Following the results of the preliminary assay, the eluted sample was diluted directly in the cell medium at the two different dilutions in order to obtain the desired final concentrations in contact with the THP-1 cells in vitro. The exposure has been carried out for 24 h at 37°C with 5% CO₂.

2.2.3 Esecuzione del test di sensibilizzazione/Sensitisation assay execution

Dopo l'esposizione alla sostanza in esame le cellule sono state esaminate con colorazione di Tripán Blue e osservazione microscopica in camera conta-globuli per la vitalità, raccolte, lavate in un tampone isotonic (PBS) e marcate con un anticorpo fluoresceinato diretto contro Intercellular Adhesion Molecule (CD54) o B7.2 (CD86) e comunque con propidio ioduro (PI) per identificare simultaneamente le cellule necrotiche (PI positive). A questo scopo 1 ml di una soluzione di PI 1 mg/ml in acqua è stata diluita in 20 ml di tampone PI (1 grammo di glucosio in 1 litro di PBS senza Ca e Mg) e aggiunta a 100mila cellule. Solo le cellule non necrotiche (PI negative) sono state usate per l'analisi dell'espressione di CD54 e CD86.

Dopo ulteriori lavaggi per asportare l'anticorpo in eccesso, le cellule sono state immerse in un citofluorimetro di flusso (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter, Becton Dickinson, Mountain View, CA) per la valutazione della MFI (Mean Fluorescence Intensity), proporzionale al numero di molecole marcate per cellula, e quindi rappresentativo del livello di espressione delle molecole co-stimolatorie da noi indagate.

Come controllo (fluorescenza di base) è stata valutata la MFI sia delle cellule THP-1 non trattate in alcuna maniera sia delle cellule THP-1 fatte reagire con un anticorpo monoclonale fluoresceinato ma di specificità irrilevante ("isotype-matched control").

After the incubation with the tested substance and the controls, cells are collected, checked under the microscope for their vitality by staining with Trypan Blue dye and counting in a cell counter chamber, washed in PBS and then marked with a fluoresceinated anti- Intercellular Adhesion Molecule (CD54) or B7.2 (CD86) antibody and in both cases with a propidium iodide (PI) solution to simultaneously measure the percentage of dead cells. To this aim, a PI working solution (1 ml PI stock solution (1 mg PI/ml water) in 20 ml PI buffer (1 g glucose/l PBS without Ca/Mg)) was added to 10⁵ cells. A gate was set on the negative cells in order to exclude the dead cells. Only viable cells were included for analyses of CD54 or CD86 expression. After washing, to eliminate the excess antibody, the MFI (Mean Fluorescence Intensity) linked to the cells was evaluated by means of a flux cytometer (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter, Becton Dickinson, Mountain View, CA). This value is proportional to the expression of co-stimulatory molecules.

The MFI of the non-treated THP-1 cells and of cells after reaction with a monoclonal isotype-matched antibody was used as an internal control (basal fluorescence).

2.2.4 *Espressione dei risultati/ Expression of results*

I risultati sono espressi come MFI (Mean Fluorescence Intensity), media geometrica dell'intensità di fluorescenza delle cellule marcate con l'anticorpo fluoresceinato, proporzionale al numero di molecole marcate per cellula.

The results are expressed in terms of MFI (Mean Fluorescence Intensity). MFI is the geometric mean of the fluorescence intensity of the cells decorated with the fluoresceinated antibody and it is proportional to the number of stained molecules per cell.

2.3 *Criteri di accettabilità del metodo/ Acceptance criteria of method*

Criteri di accettabilità del metodo/ Acceptance criteria of method

Per la vitalità cellulare

La vitalità cellulare (cellule PI negative) deve essere > 80% in tutti i campioni

Cell vitality

The percent of living cells (PI negative) must be above 80% in all samples

Per il controllo positivo

La MFI del controllo positivo alla concentrazione più bassa della sostanza utilizzata (nichel o kathon) deve essere almeno > 10% della MFI del controllo negativo. La MFI deve dimostrare un pattern incrementale di crescita alle altre due dosi testate.

For positive control

The MFI of the positive control must be > 10% of the negative control at the lowest tested concentration of the culprit substance (nichel or kathon). The MFI must display a dose-response increasing pattern with the other two tested doses.

2.4 *Interpretazione dei risultati/Results interpretation*

L'espressione delle molecole costimolatorie delle cellule trattate con il campione viene paragonata con quella delle cellule trattate con il Nichel, tipica sostanza allergizzante che è caratterizzato da a) incremento elevato di entrambi i marcatori; b) correlazione diretta dell'incremento dell'intensità della risposta con la concentrazione; c) effetto rilevabile anche a dosi molto basse.

La dose testata di 4 µg/ml di Nichel Solfato ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) corrisponde a circa 1 ppm di Nichel, valore che si colloca intorno alla dose soglia allergizzante nei soggetti già sensibilizzati e su cute irritata. La concentrazione in grado di causare una reazione allergica nella maggior parte dei soggetti sensibili si colloca tuttavia intorno a valori ben più alti, oltre le 100 ppm di Nichel Solfato- $6\text{H}_2\text{O}$, a contatto con la cute integra e sana.

The costimulatory molecules expression is compared to the behaviour of Nickel, a prototypic sensitising substance, characterised by a) high increase of both the markers; b) direct correlation between concentration and intensity of the response; c) relevant effects even at very low doses.

The tested dose of 4 µg/ml of Nickel Sulphate (NiSO₄·6H₂O) corresponds to more or less 1 ppm of Nickel, dosage that is around the minimal sensitising threshold in already sensitised individuals with irritated skin. The concentration that is able to cause an allergic reaction in most of the sensitive subjects is anyway around higher value, over the 100 ppm of Nickel Sulphate·6H₂O in contact with safe and intact skin.

I valori di MFI sono considerati significativamente incrementati a seguito della incubazione con il prodotto in esame, quando sono superiori al valore di "MFI cut-off" che si ottiene incrementando la MFI del controllo negativo di un valore percentuale definito.

Quest'ultimo si ricava dividendo la media + 2 deviazioni standard di una serie di 10 determinazioni di MFI effettuate su altrettanti campioni di controllo negativo per il valore della MFI del controllo negativo stesso. Tale determinazione è effettuata ogni 6 mesi come misura della variabilità intra-saggio.

The MFI values are considered significantly increased as a result of incubation with the test product, when they are higher than the value of "MFI cut-off" that is obtained by increasing the MFI of the negative control by defined percentage value.

The latter is obtained by dividing the mean + 2 standard deviations of a series of 10 determinations of MFI performed on as 10 negative control samples for the value of the MFI of the negative control itself. This determination is carried out every six months as a measure of intra-assay variability.

**Sede legale
e laboratori**Via Quarantadue Martiri 213/B 28924
Verbania (VB), ItaliaTel. +39 0323 586239
Fax +39 0323 496877
info@abich.itCF/VAT/Reg. Imp.
VCO: 01864020035
R.E.A: 189901
Cap. Soc. € 116.000 i.v.**Centro Studi Clinici
e Cosmetologici**Via Della Burrone 51, 20090
Vimodrone (MI), Italiawww.abich.it

3 PARTE TERZA/PART THREE RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS

3.1 *Requisiti di accettabilità del test /Assay validity requirements*

	Valore/value		Limiti/ Limits	Risultato/Result
PI (per tutti i campion/ for all the samples)	> 80%		> 80%	Conforme/ Complies
MFI CP concentrazione più bassa/ lower concentration rispetto al CN / compared to CN	+27.77 (CD54)	+24.45 (CD86)	> 10%	Conforme/ Complies

I criteri di accettabilità del test (vedi § 2.3) sono conformi, quindi il test è considerato valido.
Acceptance criteria of the assay (see § 2.3) comply, hence the assay is valid.

3.2 *Risultati/Results*

Campioni/Samples	CD54 (MFI*)	CD86 (MFI*)	PI
Nickel Sulfate 20 µg/ml	60.15	100.78	85
Nickel Sulfate 10 µg/ml	45.12	50.26	86
Nickel Sulfate 4 µg/ml	31.24	25.45	87
Eluato/Eluate Mascherine riutilizzabili Holly by Pasini 100 µl/ml	24.34	20.25	87
Eluato/Eluate Mascherine riutilizzabili Holly by Pasini 20 µl/ml	24.41	20.37	87
Controllo negativo / Negative control	24.45	20.45	88
MFI CUT OFF	25.13	20.97	-

3.3 Conclusioni/Conclusions

Nel test sopra riportato l'eluato del campione / In the above experimental conditions, the eluted sample:

Mascherine riutilizzabili Holly by Pasini

Lotto/Batch: n.p.

non aumenta in vitro l'espressione di nessuno dei marcatori indagati nei monociti umani, *mostrando quindi di non possedere un potenziale stimolatorio del sistema immunitario mediato dal monocita/macrofago.*

does not affect in this in vitro model the expression of the investigated markers in immunocompetent cells, and hence *it does not show any stimulating potential on the immune cellular response mediated by monocytes/macrophages.*

Data/Date: 06/04/2020

Il Direttore dello studio/ The Study Director
Dr. Elena Bocchietto

Documento con firma digitale

Sede legale
e laboratori

Via Quarantadue Martiri 213/B 28924
Verbania (VB), Italia

Tel. +39 0323 586239
Fax +39 0323 496877
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp.
VCO: 01864020035
R.E.A: 189901
Cap. Soc. € 116.000 i.v.

Centro Studi Clinici
e Cosmetologici

Via Della Burrone 51, 20090
Vimodrone (MI), Italia

www.abich.it

4 **PARTE QUARTA/PART FOUR**

Bibliografia/Bibliography

- 1) EURL ECVAM RECOMMENDATION on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. February 2015.
- 2) OECD 442E GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. In vitro Skin Sensitization: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). 29 July 2016.
- 3) E. Bocchietto, C. Paolucci, D. Breda, E. Sabbioni and SE Burastero. Human monocytoïd THP-1 cell line versus monocyte-derived human immature dendritic cells as in vitro models for predicting the sensitising potential of chemicals. International Journal of immunopathology and pharmacology Vol. 20 n°2, 261-268 (2007)
- 4) T. Ashikaga, Y Yoshida, H. Hirota et al, 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. Toxicology in vitro 20 (2006) 767-773.
- 5) H. Sakaguchi, T. Ashikaga, M. Miyazawa et al., 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. Toxicology in vitro, Vol 20 Issue 5 August 2006 Pages 776-784.
- 6) Masato Mizuashi, Tomoyuki Ohtani, Satoshi Nakagawa et al, Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. J Invest Dermatol 124:579-586, 2005.
- 7) Bocchietto E, Paolucci C, Breda D, Pecis L , Burastero S. *In vitro* prediction of contact sensitization: simultaneous evaluation of dendritic cells and of T lymphocytes in a coculture system. Atti del Congresso internazionale della Contact Dermatitis Society, Roma, 11-16 giugno 2002.
- 8) De Silva O et al. Alternative methods for skin sensitisation testing. ATLA, 1996; 24:683-705.
- 9) Thompson CB. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? Cell 1995;81:979-82.
- 10) Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, Weiner HL, Nabavi N, Glimcher LH. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. Cell 1995;80:707-18.
- 11) Hofer MF, Jirapongsananuruk O, Trumble AE, Leung DY. Upregulation of B7.2, but not B7.1, on B cells from patients with allergic asthma. J Allergy Clin Immunol 1998;101:96-102.
- 12) Larche M, Till SJ, Haselden BM, North J, Barkans J, Corrigan CJ, Kay AB, Robinson DS. Costimulation through CD86 is involved in airway antigen-presenting cell and T cell responses to allergen in atopic asthmatics. J Immunol 1998;161:6375-82.

- 13) Van Neerven RJ, Van de Pol MM, Van der Zee JS, Stiekema FE, De Boer M , Kapsenberg ML. Requirement of CD28-CD86 costimulation for allergen-specific T cell proliferation and cytokine expression. Clin Exp Allergy 1998;28:808-16.
- 14) Burastero SE, Magnani Z, Confetti C, Balbo P, Oddera S, Rossi GA. CD80 expression on alveolar macrophages and presence of airway eosinophils in asthma and in rhinitis before and after allergen challenge. Eur Respir J 1998;12 (suppl. 28):112s.
- 15) Burastero SE, Magnani Z, Confetti C, Abbruzzese L, Oddera S, Balbo P, Rossi GA, Crimi E. Increased expression of the CD80 accessory molecule by alveolar macrophages in asthmatic subjects and its functional involvement in allergen presentation to autologous TH2 lymphocytes. J Allergy Clin Immunol 1999;103:1136-42.
- 16) Burastero S, Magnani Z, Confetti C, Abbruzzese L, Oddera S, Balbo P, Rossi G, Crimi E. Increased expression of the CD80 accessory molecule by alveolar macrophages in asthmatic subjects and its functional involvement in allergen presentation to autologous TH2 lymphocytes. J All Clinical Immunol 1999;103:1136-1142.

ALLEGATO ALLA RELAZIONE/ ENCLOSURE TO THE REPORT 0802-2020

MFI CUT OFF VARIABILITÀ INTRA-SAGGIO/ INTRA ASSAY VARIABILITY

	CD86	C54
1	20,34	24,54
2	21,09	24,56
3	20,67	24,99
4	20,65	25,54
5	20,89	24,34
6	20,98	24,65
7	20,43	24,89
8	20,65	24,67
9	20,54	24,67
10	20,34	24,42
<u>mean</u>	20,66	24,73
SD	0,26	0,35
<u>mean + 2 SD</u>	21,18	25,42
<u>ratio</u>	1,03	1,03
<u>% above mean</u>	2,53%	2,80%
<u>min</u>	20,34	24,34
<u>max</u>	21,09	25,54

Sede legale
e laboratoriVia Quarantadue Martiri 213/B 28924
Verbania (VB), ItaliaTel. +39 0323 586239
Fax +39 0323 496877
info@abich.itCF/VAT/Reg. Imp.
VCO: 01864020035
R.E.A: 189901
Cap. Soc. € 116.000 i.v.Centro Studi Clinici
e CosmetologiciVia Della Burrone 51, 20090
Vimodrone (MI), Italiawww.abich.it