

Green Red Marketing Solutions GmbH
Reeshoop 1
D-22926 Ahrensburg

Münster, 11.04.2023

Bericht über einen in vitro Augenirritationstest
gemäß OECD TG 492
Entwicklung der Gewebevitalität von
humanen rekonstruierten EpiOcular™ 3D-Modellen
nach Anwendung des Testprodukts

NO Odor

Studiennummer: 2303171929
In vitro Modell: EpiOcular™; MatTek Corporation (Bratislava, Slowakei)
Positivkontrolle: Methylacetat
Negativkontrolle: PBS
Anwendungszeit: 30 Minuten
Analysemethode: MTT-Vitalitätstest (quantitative Bestimmung)
Ergebnis: nicht irritierend

Inhalt

1	Zusammenfassung	3
2	Einleitung	3
2.1	OCL-200-EIT OECD TG 492.....	3
2.2	Das humane EpiOcular™ 3D-Corneamodell	4
3	Methode	4
3.1	Kultivierung der Modelle.....	4
3.2	Kontrollen	5
3.3	Produktart	5
3.4	Produktapplikation	5
3.5	MTT-Vitalitätstest.....	5
3.6	Vitalitätsmessung mittels MTT-Tests	6
3.7	Berechnung	6
3.8	Literatur.....	6
4	Studiendesign & Durchführung	7
5	Ergebnisse.....	8
5.1	MTT-Vitalitätstest.....	8
5.2	Akzeptanzkriterien	8
6	Vorhersagemodell und abschließende Bewertung	9
7	Anhang 1: Analysenzertifikat von MatTek.....	10

1 Zusammenfassung

Das Produkt **NO Odor** wurde in vitro auf der Grundlage des Protokolls für den Augenreizungstest (OCL-EIT-200) für Flüssigkeiten [5, ECVAM-Datenbank] auf eine potenzielle Reizung der Augen getestet. Zu diesem Zweck wurden EpiOcular™ 3D-Corneamodelle verwendet, deren Vitalität nach Anwendung des Testprodukts mittels eines MTT-Tests analysiert wurde. 50 µl des Produkts **NO Odor** wurde mittels Pipette topisch auf 3 unabhängige Modelle appliziert und für 30 Minuten auf den Modellen inkubiert. Nach Entfernung der Testsubstanz wurden die Modelle für 12 Minuten in 5 ml frischem Medium inkubiert („post soak“) und anschließend für weitere 2 Stunden in 1 ml Medium inkubiert (Postinkubation). Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) diente als Negativkontrolle (Referenz, 100 % Vitalität). Methylacetat (unverdünnt) wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Analyse wurde für jede Prüfsubstanz in dreifacher Ausfertigung durchgeführt (3 unabhängige Modelle). Wie in Abbildung 3 dargestellt, betrug die durchschnittliche Gewebevitalität nach 30 Minuten Produktinkubation, 12 Minuten Nachtränkphase („post soak“) und 120 Minuten Postinkubation 104,6 % für das Testprodukt im Vergleich zur Negativkontrolle (Referenz, 100 % Vitalität). Gemäß der UN-GHS-Klassifizierung und der neuen EU-Klassifizierung auf der Grundlage der Verordnung über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung (CLP) (zur Umsetzung des UN-GHS in der EU) ist das Testprodukt **NO Odor** als nicht reizend einzustufen.

2 Einleitung

Heutzutage gewinnen in vitro Testverfahren als sehr gute Alternative zu bisher notwendigen Tierversuchen in der Industrie immer mehr an Bedeutung. Für Produkte, die oft über einen langen Zeitraum verwendet werden, ist eine dermatologische Testung auf Unbedenklichkeit eine essentielle Voraussetzung für eine hohe Anwendungssicherheit und Kundenzufriedenheit. Bei der Entwicklung neuer Produkte treten biologische Effekte von einzelnen aktiven Ingredienzien oder auch vollständigen Rezepturen immer mehr in den Fokus des kosmetischen Interesses. Durch die Bestimmung und Bewertung verlässlicher und reproduzierbarer biologischer Endpunkte kann eine Aussage über die Einflüsse eines Produktes auf regenerative, protektive, irritierende oder korrosive biologische Prozesse der Haut getroffen werden.

2.1 OCL-200-EIT OECD TG 492

Das EpiOcular™ EIT-Protokoll wird für die Vorhersage von Stoffen verwendet, die akute Augenirritationen hervorrufen. Es diente als teilweiser Ersatz für das früher verwendete Kaninchen-Draize-Augenreizungsprotokoll an lebenden Organismen (Methode B.5 Anhang V der Richtlinie 67/548/EWG oder OECD TG 405). Das aktuelle Protokoll wurde vom Team der COLIPA (European Cosmetics Association) validiert. Der EpiOcular™ EIT kann verwendet werden, um irritierende Chemikalien, die nach der früheren EU-Klassifizierung auf der Grundlage der Richtlinie über gefährliche Stoffe (DSD) als R36 oder R41 oder nach der UN-GHS-Klassifizierung und der neuen EU-Klassifizierung auf der Grundlage der Verordnung über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung (CLP) (zur Umsetzung des UN-GHS in der EU) als Kategorie 1 oder Kategorie 2 eingestuft werden müssen, von solchen Chemikalien zu unterscheiden, die nicht eingestuft werden müssen. Der Test kann nicht zur Unterscheidung zwischen Reizstoffen der Kategorie 1 (stark) und der Kategorie 2 (leicht) verwendet werden. Zu diesem Zweck müssen zusätzlich validierte Tests wie der BCOP (Bovine corneal opacity and permeability test) oder ICE (Isolated Chicken Eye test) durchgeführt werden, um der "Bottom-up"-Strategie zu folgen [4].

2.2 Das humane EpiOcular™ 3D-Corneamodell



Abb.1 Das EpiOcular™ 3D-Corneamodell

Histologischer Schnitt eines EpiOcular™ 3D-Corneamodells. Gut zu erkennen ist die *in vivo* ähnliche Morphologie der basalen (gestreckten) und der apikalen (abgeflachten) Zellen.

Das humane EpiOcular™ 3D-Corneamodell zeigt die typische *in vivo* ähnliche Morphologie und Wachstumscharakteristik. Es besteht aus hochorganisierten basalen Zellen, welche zur apikalen Spitze hin eine kontinuierlich abgeflachte Morphologie aufweisen, vergleichbar mit dem humanen Cornea Epithel. Das Modell ist sowohl metabolisch als auch mitotisch aktiv und sezerniert viele proinflammatorische Zytokine, welche für die Bestimmung einer okularen Irritation und Entzündung herangezogen werden können. Diese Eigenschaften machen das Modell zur idealen Testplattform für okuläre Sicherheitsbewertungen [2].

3 Methode

In der vorliegenden Studie wurden EpiOcular™ 3D-Corneamodelle verwendet, um eine potentiell irritierende Eigenschaft des Produkts **NO Odor** zu untersuchen. Die Testung erfolgte anhand des validierten Protokolls EpiOcular™ Eye Irritation Test (OCL-200-EIT), welches OECD TG 492 konform ist. Diese Testung ist allgemein als gleichwertiger Ersatz für *in vivo* Augenirritationstestungen (Draize-Test, OECD TG 404, 405) an Kaninchen anerkannt. Derartige Testungen werden zur Identifikation und Klassifizierung des irritierenden Potentials von Substanzen verwendet, um die rechtlichen Mindestanforderungen der Erfassung, Bewertung, Zulassung und Eingrenzung von Chemikalien zu erfüllen. Anhand des Tests kann das Gefahrenpotential von Feststoffen, Flüssigkeiten, halbfesten Stoffen, in Wasser löslichen oder unlöslichen Stoffen, nicht jedoch von Gasen oder Aerosolen, in Mono- oder Multikomponententestprodukten bestimmt werden. Die Testung nach OECD TG 492 ermöglicht die Identifikation von augenirritierenden Substanzen und deren Klassifizierung in nicht irritierend (keine Kennzeichnungspflicht in der EU) und augenirritierend GHS-Kategorie 1 oder 2 (keine Subklassifizierung möglich).

3.1 Kultivierung der Modelle

Die verwendeten 3D-EpiOcular™-Modelle (Lot: 38513, Herstellungsdatum: 03.04.2023) wurden bei der Firma MatTek, Bratislava, Slowakei erworben und unter idealen atmosphärischen Bedingungen bei 37°C, 95 % H₂O und 5 % CO₂ nach Angaben des Herstellers kultiviert.

3.2 Kontrollen

Methylacetat (MatTek, Lot: 010323 MSA, Haltbarkeitsdatum: 03.01.2024) wurde als Positivkontrolle verwendet. PBS (MatTek, Lot: 022123 MSA, Haltbarkeitsdatum: 21.02.2024) diente als Negativkontrolle. Beide Kontrollen wurden bei der Firma MatTek, Bratislava, Slowakei erworben.

3.3 Produktart

Bei dem Testprodukt **NO Odor** handelt es sich um eine flüssige, durchsichtige Substanz.

3.4 Produktapplikation

50 µl des Produkts **NO Odor** wurde mittels Pipette topisch auf 3 unabhängige Modelle appliziert und für 30 Minuten auf den Modellen inkubiert. Nach Entfernung der Testsubstanz wurden die Modelle für 12 Minuten in 5 ml frischem Medium (MatTek, Lot.: 040323 ISA, Haltbarkeitsdatum: 24.04.2023) inkubiert („post soak“) und anschließend für weitere 2 Stunden in 1 ml Medium inkubiert (Postinkubation). Als Positivkontrolle wurde Methylacetat verwendet. Als Negativkontrolle diente PBS (Referenz).

3.5 MTT-Vitalitätstest

Vitalität ist als allumfassende Kapazität des Lebens definiert. Unter diesem Begriff summieren sich alle metabolischen Aktivitäten, welche die Zelle für den existentiellen Grundbedarf, Wachstum und Teilung benötigt (Bspw.: Respiration, Glykolyse etc.). Eine etablierte Methode, um Viabilität in Geweben zu messen, ist der MTT-Vitalitäts-Test. 3-(4,5-Dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid oder kurz MTT, ist ein gelbes, wasserlösliches Salz, welches im Zellinneren durch die Spaltung des Tetrazolium-Rings reduziert und in wasserunlösliches, purpur-blaues Formazan umgewandelt wird [4]. Das kristalline Formazan präzipitiert in das zelluläre Zytosol wobei die Menge des Präzipitats quantitativ mit der allgemeinen zellulären Vitalität korreliert. Daher kann der MTT-Test als Indikator der „Vitalität oder Fitness“ eines Gewebes bezeichnet

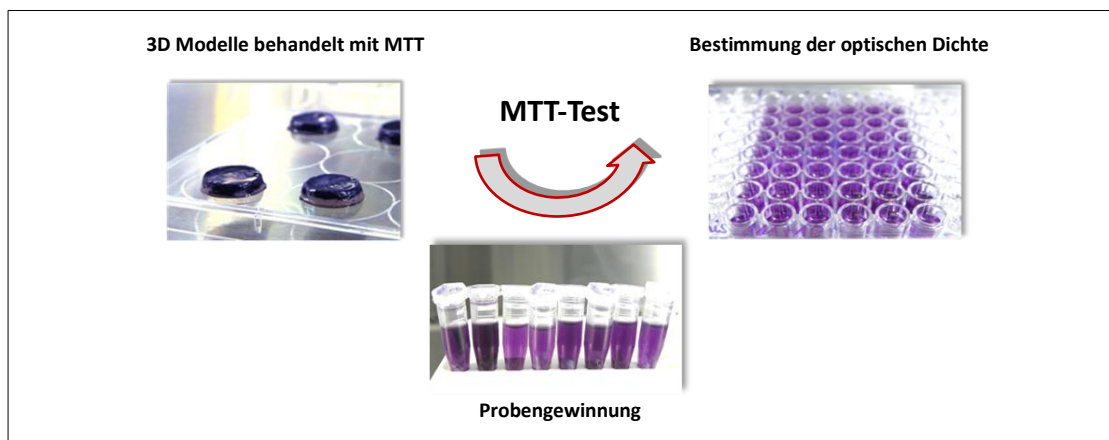


Abb. 2 exemplarische Darstellung eines MTT-Tests

Die Hautmodelle werden in einem Medium/MTT-Gemisch (1 mg/ml MTT) für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Extraktion des reduzierten MTT geschieht mit azidem Isopropanol, der die Zellen auflöst und die gebildeten Formazankristalle freisetzt. Die kolorimetrische Messung des im Gewebe umgesetzten Formazans wird bei OD_{570 nm} durchgeführt. Aus den gemessenen OD's kann dann die prozentuale „Vitalität“ ermittelt werden.

werden, weil zelluläre Prozesse der Respiration und der Energiegewinnung zur Reduktion des MTT führen. Nachdem die MTT-Reaktion gestoppt ist, wird das präzipitierte Formazan mittels chemischer Lyse vollständig aus den Geweben freigesetzt. Die optische Dichte (OD) der Formazanlösungen wird mittels kolorimetrischer Messung ermittelt. Aus den optischen Dichten der Lösungen wird die „Vitalität“ in Prozent berechnet.

3.6 Vitalitätsmessung mittels MTT-Tests

Die Modelle wurden wie unter 3.3 angegeben mit der jeweiligen Testsubstanz beprobt und inkubiert. Nach Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Modelle mit sterilem PBS gewaschen und der Boden der Modellgefäße auf einem Tuch abgetupft, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Die Modelle wurden anschließend in eine neue 24 Well-Platte überführt. Jedes Well der Platte beinhaltet 0,3 ml MTT (1mg/ml). Um die richtige MTT-Konzentration zu erhalten, wurde 5mg/ml MTT (MatTek, Lot.: 022823 MJA, Verfallsdatum: 28.04.2023) mittels MTT-Diluent (MatTek, Lot.: 2436364, Verfallsdatum: 30.09.2023) verdünnt. Die Modelle wurden dann für 3 h bei 37°C, 95 % H₂O, 5 % CO₂ im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Modellgefäße auf ein steriles Tuch überführt und für 10 – 15 Sekunden liegen gelassen, um überschüssiges Medium/MTT Gemisch zu entfernen. Anschließend wurden die Modelle in eine neue 24-well Platte überführt und mit 2 ml Isopropanol (MatTek, Lot.:121422 KMB, Verfallsdatum: 14.12.2023) zur Formazanextraktion überschichtet. Um die Evaporation des Lösungsmittels zu minimieren, wurde die Platte mit Parafilm versiegelt und anschließend mit Aluminiumfolie ummantelt. Die Extraktion erfolgte bei 5°C über Nacht in Dunkelheit. Die optische Dichte aller Formazanextrakte wurde anschließend bei OD_{570nm} bestimmt.

Vor dem eigentlichen Versuchsansatz wurde getestet, ob die Testsubstanz **NO Odor** das MTT-Reagenz intrinsisch zu reduzieren vermag (MTT-Reducer). Dazu wurden 50 µl der Testsubstanz zu 1 ml MTT-Medium Gemisch hinzugegeben, und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert (Referenz; nur MTT-Medium Gemisch). Dabei zeigte sich keine Verfärbung der MTT-Lösung. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Testsubstanz das MTT intrinsisch reduzieren kann.

3.7 Berechnung

Die optische Dichte der Negativkontrolle wird 100 % Vitalität gesetzt. Die Vitalität der Positivkontrolle sowie der Testsubstanz berechnet sich wie folgt:

$$\text{Vitalität [\%]}^1 = \frac{\text{optische Dichte Positivkontrolle oder Testprodukt}}{\text{optische Dichte Negativkontrolle}} * 100$$

¹die optischen Dichten werden zuvor korrigiert indem man den Mittelwert der optischen Dichte des Isopropanols von der optischen Dichte der Testsubstanz, Positiv- und Negativkontrolle abzieht. Die detaillierte Berechnung kann dem Protokoll (OCL-200-EIT, ECVAM Datenbank, Seite 20 – 21) entnommen werden.

3.8 Literatur

- [1] Hayden, P., et al., (2011) „Use of normal Human 3D Tissue models (EpidermTM,EpiarrayTM) for Nanotoxicology Applications“, GTAM 2011, Newark, USA
- [2] Alepee, et al., (2014) “Sub-categorisation of skin corrosive chemicals by the EpiskinTM reconstructed human epidermis skin corrosion test method according to UN GHS: revision of OECD Test Guideline 431”, Toxicology *in vitro* Mar;28(2);131-45

- [3] Yin, X.J., et. al., Prediction of Ocular Irritation Potential of Surfactant-based formulations at different concentrations using the epioocular model. MatTek Corp.514
- [4] Berridge, M.V., et al. (1996) "The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts". *Biochemica*. No.4: 14-19
- [5] EpiOcular™ Eye Irritation test (OCL-200-EIT), MatTek Corporation Ashland, USA

4 Studiendesign & Durchführung

Ziel der vorliegenden Analyse war es, das augenirritierende Potential der Produktes **NO Odor** anhand der OECD TG 492 (Irritation der Augen) Richtlinie an humanen 3D-Modellen (EpiOcular™) nach einmaliger, topischer Applikation zu untersuchen. Als Referenzwerte wurden Modelle mit PBS behandelt. Pures Methylacetat wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Applikation der Testsubstanz erfolgte als Triplikat (3 unabhängige Modelle). Alle Kontrollen und behandelten Modelle wurden parallel unter identischen Bedingungen kultiviert, präpariert und analysiert.

Tabelle 1: Studiendesign und Durchführung

Experimentelles Design der Studie OECD TG 492	
Topische Applikation des zu testenden Produktes:	
NO Odor	
Testsubstanz je 50 µl	Inkubationszeit / Anzahl der verwendeten Modelle
	30 min+ 12 min „post soak“ Phase + 120 min Postinkubation
PBS	3
Methylacetat (Eisessig)	3
NO Odor	3
Endpunkt	MTT-Vitalitätstest

5 Ergebnisse

5.1 MTT-Vitalitätstest

Tabelle 2: Ergebnisse des Testprodukts und der Kontrollen

Probe	PBS			Methylacetat			NO Odor		
Optische Dichte	1,762	1,587	1,550	0,475	0,541	0,527	1,672	1,649	1,804
Vitalität [%]	100			31,5			104,6		
Variationskoeffizient [%]	7,0			6,8			4,9		

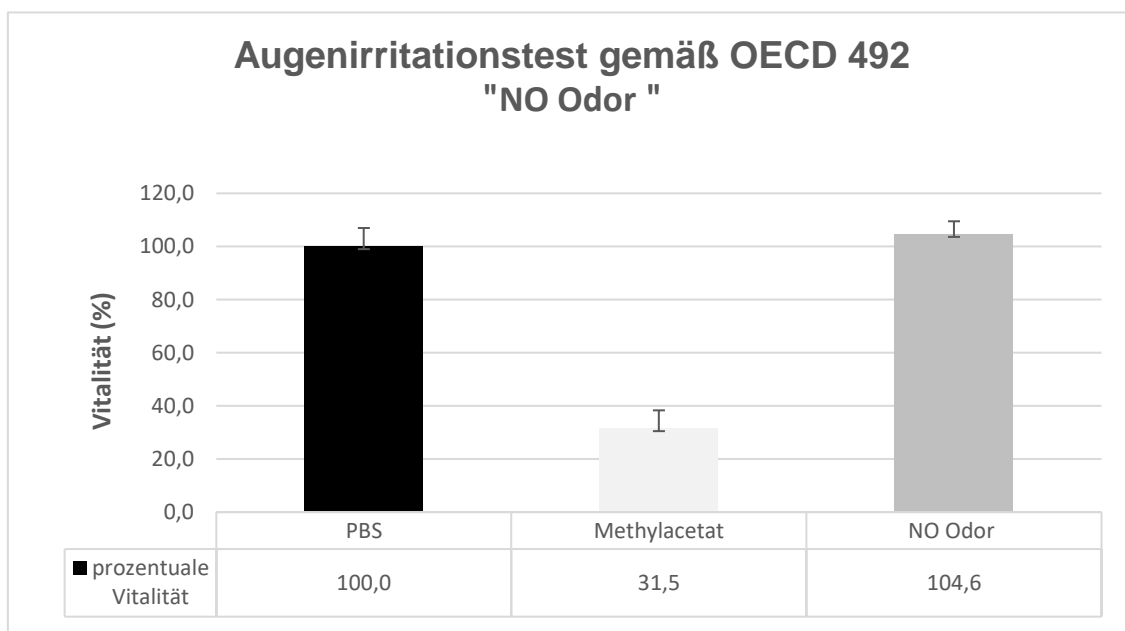


Abb.3: Zusammenfassende Darstellung des MTT-Vitalitätstests nach 30 Minuten Produktinkubation, 12 Minuten "Post-Soak"-Phase und 120 Minuten nach der Inkubation mit dem Testprodukt.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, lag die durchschnittliche Vitalität der Modelle, welche mit **NO Odor** behandelt wurden bei 104,6 %, verglichen mit den Referenzmodellen (100 % Vitalität). Die Positivkontrolle (Methylacetat) zeigte erwartungsgemäß eine deutliche Vitalitätsreduktion von 31,5 %.

5.2 Akzeptanzkriterien

Eine Irritationstesting mit EpiOcular™ 3D-Modellen wird als valide angesehen, wenn:

- Die optische Dichte der Negativkontrolle (deionisiertes Wasser) $\geq 0,8$ und $\leq 2,8$ bei 570_{nm} liegt. Die durchschnittliche optische Dichte der Negativkontrolle lag bei **1,633** und somit innerhalb der Toleranzgrenze.

- Der Vitalitätsmittelwert der Positivkontrolle Methylacetat (Eisessig, pur) $\leq 60\%$ in Relation zur Negativkontrolle liegt. Da der Vitalitätswert der Positivkontrolle bei **31,5 %** im Mittel lag, sind die Kriterien der Positivkontrolle erfüllt.
- Die Differenz der Vitalitäten der einzelnen Modelle, sowie für die Negativ- und Positivkontrolle, als auch für die Testsubstanz $\leq 20\%$ ist
Die Differenzen der Vitalitäten der einzelnen Modelle liegen alle unterhalb von 20 %.

Die durchgeführte Testung erfüllt alle Akzeptanzkriterien und kann somit als valide angesehen werden.

6 Vorhersagemodell und abschließende Bewertung

Liegt die Gewebevitalität der mit der Testsubstanz behandelten Modelle $> 60\%$, relativ zur Negativkontrolle, kann die Testsubstanz als nicht irritierend eingestuft werden. Liegt die Gewebevitalität der mit der Testsubstanz behandelten Modelle $\leq 60\%$, relativ zur Negativkontrolle, ist die Testsubstanz als irritierend einzustufen.

In vitro Ergebnis	In vivo Vorhersage
durchschnittliche Gewebevitalität $\leq 60\%$	Irritierend (I)
durchschnittliche Gewebevitalität $> 60\%$	Nicht-irritierend (NI)

Die durchschnittliche Vitalität der humanen 3D-Okularmodelle, welche mit dem Testprodukt behandelt wurden war $> 60\%$. Daher ist das Testprodukt **NO Odor** als

Nicht-irritierend (NI)

einzustufen. Gemäß der UN GHS und der EU CLP ist das Testprodukt nicht kennzeichnungspflichtig.



Dr. med. Werner Voss
Facharzt für Dermatologie,
Venerologie, Allergologie,
Phlebologie und
Umweltmedizin



Dr. med. Gerrit Schlippe
Facharzt für Dermatologie und
Venerologie

7 Anhang 1: Analysenzertifikat von MatTek



Certificate of Analysis

Product: EpiOcular™ Tissue

Lot Number: **38513**

Part#: OCL-200, OCL-212, OCL-200-EIT, OCL-212-EIT

Description: Reconstructed ocular tissue containing normal human keratinocytes.
This product is for research use only. Not for use in animals, humans or diagnostic purposes.

I. Cell source

All cells used to produce EpiOcular™ are purchased or derived from tissue obtained by MatTek Corporation from accredited institutions. In all cases, consent was obtained by these institutions from the donor or the donor's legal next of kin, for use of the cells or derivatives of the tissue for research purposes.

Keratinocyte Strain: **4F1188**

II. Analysis for potential biological contaminants

The cells used to produce EpiOcular™ tissue are screened for potential biological contaminants. Tests performed for each of the potential biological contaminant listed in the analysis that follows, where performed according to the test method given. The product resulted in "no detection" for the following potential biological contaminants determined by the stated test method:

Keratinocytes:

HIV-1 virus – Oligonucleotide-directed amplification	Not detected
Hepatitis B virus – Oligonucleotide- directed amplification	Not detected
Hepatitis C virus – Oligonucleotide- directed amplification	Not detected
Bacteria, yeast, and other fungi – long term antibiotic, antimycotic free culture	Not detected

III. Analysis for tissue functionality

Test	Specification	Acceptance criteria	Result and QA Statement	
Tissue viability	MTT QC assay, 1 hour, n=3	OD (540-570 nm) [1.1-3.0]	1.577 ± 0.060	Pass
Barrier function	ET-50 assay, 100 µl 0.3% Triton X-100, 3 time-points, n=2, MTT assay	ET-50 [12.2-37.5 min]	12.85 min	Pass
Sterility	Long term antibiotic and antimycotic free culture	No contamination	Sterile	Pass

Tissue viability and the barrier function tests are within the acceptable ranges and indicate appropriate formation of the mucosal barrier and a viable basal cell layer.

Initials: **IS**

Date: **4/4/23**

Nelson Rivas
Quality Assurance Department
Document Control Manager

April 4, 2023

Date

CAUTION: Whereas all information above is believed to be accurate and correct, no absolute guarantee that human derived material is non-infectious can be made or is implied by this certificate of analysis. All tissues should be treated as potential pathogens. The use of protective clothing and eyewear and appropriate disposal procedures is strongly recommended.

MatTek Corporation

www.mattek.com

support@mattek.com

MatTek Headquarters
MatTek Europe

200 Homer Avenue, Ashland, MA - USA
Mlynské Nivy 73, Bratislava - Slovakia

+1-508-881-6771
+421-2-3260-7401

QC-10-012-0011 Rev. B

Page 1 of 1

MatTek Corporation

EpiOcular QC (OCL-200)

LOT 38513
 TESTED Post Refrigerated Storage
 COMMENTS No

TESTING DATE 04.04.2023

Dosed with: 0.3% Triton X-100 (100uL)

Exposure Time (min)	Well	OD	MTT (OD)	Std Dev (OD)	Viability %	Std Dev (%)
5	1	1.0297	1.038	0.011	66.6	0.7
	1	1.0454				
20	1	0.659	0.657	0.003	42.2	0.2
	1	0.6553				
60	1	0.1539	0.150	0.006	9.6	0.4
	1	0.146				
H2O	1	1.6242	1.557	0.060	100.0	3.9
	1	1.5078				
	1	1.5392				

Avg. cv (%): 2.3 Exp. Cv (%): 2.3

ET-50 (min): 12.85

EPIOCULAR QC (OCL-200) Acceptance Criteria
 Based on 1996 QC Database

	TRI (MIN)	H2O MTT (OD)
greater than	12.2	1.10
less than	37.5	n.a.
1996 avg.	24.9	
std. dev.	6.3	

QC Evaluation: PASS

Initials: JS
 Date: 4/4/2023