

Evaluation of the potential to cause ocular irritation of the samples provided by the Customer

Valutazione del potenziale irritativo oculare di campioni forniti dal Cliente

Utilizing the
Utilizzando il

Ocular Irritection® test method

Enclosed (*Allegati*):

- Introduction
- Scientific Background
- Bibliography
- Information for the customized service



OI001



INT.E.G.RA. S.r.l. Introduction

INTRODUCTION

Effettuando i test di irritazione cutanea ed oculare *in vitro* con il metodo IRRITECTION™, sarà possibile vantare conoscenze sul prodotto come altrimenti non sarebbe possibile.

the reasons why using the IRRITECTION™ Assay System.

The Irritection™ Assay System (IAS) consists of newly-developed test kits, instrumentation and computer software that have been integrated to provide an automated in vitro testing capability that detects, predicts and ranks the ocular and Dermal irritation potential of several types of materials. Because the system is reliable, rapid and cost-effective, it can be readily employed as a broad-screen complement or as a complete replacement test for in vivo test methods. Consequently, the Irritection system can be used as an efficient tool that substantially reduces the cost of developing products such as cosmetics, pharmaceuticals, petrochemical formulations, surfactant-containing compounds and a wide variety of consumer products. In the proposed OECD testing and evaluating strategy for eye irritation/corrosion (ECVAM Workshop Report 34, page 64) Ocular Irritection™ could be the single valid test which encloses the assessments of point 5 (severe eye irritant) and point 6 (eye irritation). In case of validation, only assessment of skin corrosion (point 7) would be necessary, with no further tests on rabbit eye.

Lo scopo per cui viene condotto un test con il metodo IRRITECTION™:

il metodo IRRITECTION™ (IAS) consiste in un sistema recentemente sviluppato, composto da kits da laboratorio, strumentazione e software informatico, che sono stati integrati per fornire la possibilità di testare in vitro con un sistema automatico per indagare, predire, e determinare il potenziale irritativi cutaneo ed oculare di diversi tipi di sostanze. Poiché il sistema è affidabile, rapido e il costo è competitivo, può essere usato, per un utilizzo immediato, come supporto di screening, oppure come un test completamente sostitutivo dei metodi in vivo. L'Irritection Assay System può quindi rappresentare uno strumento efficiente che riduce sensibilmente i costi di sviluppo di prodotti quali: cosmetici, prodotti farmaceutici, formule petrolchimiche, composti contenenti tensioattivi, e una vasta gamma di prodotti di consumo. Nella strategia di test e valutazione proposta a OECD per l'irritazione oculare/corrosività (ECVAM Workshop Report 34, page 64), Ocular Irritection™ può essere l'unico test valido che comprende la definizione del punto 5 (severe eye irritant) e punto 6 (eye irritation). in caso di validazione solo la definizione della corrosività cutanea (punto 7) sarebbe necessaria, senza nessun altro test successivo sull'occhio del coniglio.

**FAQ - Domande frequenti:**

- 1) What is the aim of the test? ...detects, predicts and ranks ranks the ocular and Dermal irritation potential of several types of materials.
Quale è lo scopo del test?... indagare, predire, e determinare il potenziale irritativi cutaneo ed oculare di diversi tipi di sostanze...
- 2) Is it a replacement of in vivo tests? Yes: it can be readily employed as a broad-screen complement or as a complete replacement test for in vivo test methods.
Può sostituire il test in vivo? Si: ... può essere usato, per un utilizzo immediato, come supporto di screening, oppure come un test cpmleamente sostitutivo dei metodi in vivo...
- 3) How can I use the results? ...could be the single valid test which encloses the assessments of point 5 (severe eye irritant) and point 6 (eye irritation)...
Che tipo di uso se ne può fare?... può essere l'unico test valido che comprende la definizione del punto 5 (severe eye irritant) e punto 6 (eye irritation).

Examples of possibile CLAIMS using IRRITECTION™ Method.**Esempi di rivendicazioni supportabili con il Metodo IRRITECTION™.**

- compatibilità cutanea testata in vitro
- compatibilità cutanea testata
- irritazione oculare (o cutanea) testata in vitro
- non irritante per la pelle /cute (solo se i risultati dei test sono particolarmente favorevoli)
- non irritante per gli occhi (se i risultati dei test OCULAR IRRITECTION lo confermano)
- NO TEARS / NIENTE LACRIME (o simili)

note:

- *il test "dermatologico" dovrebbe coinvolgere il parere di un dermatologo non solo per quanto riguarda un parere finale, o una "supervisione", ma proprio nell'esecuzione del test. Questo claim viene considerato ormai obsoleto.*
- *il test "clinico" implica un protocollo e un metodo di valutazione che coinvolga delle pratiche cliniche (il patch test lo è raramente, e di solito sono richiesti 150 – 200 volontari)*
- *le rivendicazioni relative ai test oculari sono difficilmente supportabili con test sull'uomo!*



SCIENTIFIC BACKGROUND

The Irritection® test system is an innovative test that includes the use of purposely designed matrix and of the equipment necessary to read and elaborate the resulting data with a dedicated software that permits the identification and prediction of the ocular irritation potential of the products in the different forms available.

This system is extremely fast and reliable and therefore can be used to add the irritant factor to previously completed product experiments or to extend the tests made on larger ranges of products.

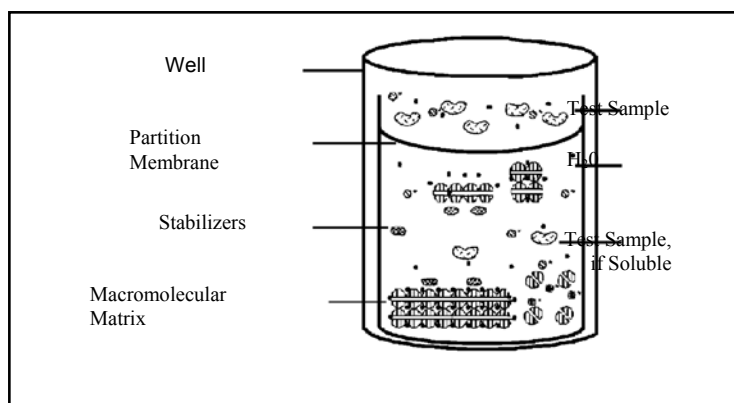
The initial reason for developing the Irritection® test was the idea that an *in vitro* test could reliably substitute the Draize test. Consequently, the research focused on the understanding of the mechanisms that are responsible for the corneous opacification and the skin irritation observed in *in vivo* tests with the intention of identifying the matrix that could substitute the dermal and corneous protein damaged through contact with the substances under examination. This research brought about the development of the Eyetex™ and Skintex™ protocols that in turn led to the development of the current Irritection® test.

Il saggio Irritection® consiste in un test di approccio innovativo, che comprende l'impiego di matrici appositamente studiate e della strumentazione necessaria alla lettura ed alla elaborazione dei dati di risposta, attraverso un software dedicato che permette di determinare e predire il potenziale irritativo dei prodotti nelle diverse forme in cui si possono presentare.

Poiché il sistema risulta altamente affidabile e rapido, permette l'impiego anche nelle fasi sperimentali pregresse, aggiungendo il potere irritante ai parametri discriminanti per lo studio dei prodotti, o l'estensione dei controlli alle gamme più ampie.

*L'impulso iniziale allo sviluppo del test Irritection® è stata l'idea che un test *in vitro* potesse sostituire in modo affidabile il Draize test. Conseguentemente le ricerche furono focalizzate sulla comprensione dei meccanismi responsabili della opacificazione corneale e della irritazione cutanea osservata nei test *in vivo* e finalizzate alla identificazione delle matrici che potessero sostituire le proteine del derma e della cornea danneggiate dal contatto con le sostanze in esame. Queste ricerche portarono allo sviluppo dei protocolli Eyetex™ e Skintex™, che sono confluiti nello sviluppo dell'attuale test Irritection®.*

Figure 1. Modello operativo del protocollo





OI001



INT.E.G.RA. S.r.l. Introduction

It is a known fact that eye and skin irritation tests are based on well known biochemical mechanisms. In particular, it has been demonstrated that the corneous, in normal conditions, is transparent due to structural formation of the proteins and the carbohydrates form which it is formed and which show a marked state of internal organisation. When the irritating agents are placed on the eye, they modify the quaternary structural formation of the proteins, causing the corneous opacification that constitutes a parameter of observation of the Draize test. In the development of the Irritection® test, it was discovered that this process can be emulated *in vitro* when the irritant agents are applied to a mixture of proteins and glycoproteins.

*E' noto che i test di irritazione oculare sono basati su meccanismi biochimici conosciuti. In particolare, è stato dimostrato che la cornea, in condizioni normali, risulta trasparente per via delle conformazioni strutturali delle proteine e dei carboidrati di cui è composta, che presentano un alto stato di organizzazione interna. Quando gli agenti irritanti sono posti sull'occhio, alterano la conformazione strutturale quaternaria delle proteine, producendo l'opacizzazione cornea che costituisce un parametro di ossevezione del Draize test. Nello svilppo del test Irritection® è stato scoperto che questo processo può essere emulato *in vitro* quando gli agenti irritanti vengano applicati ad una miscela di proteine e glicoproteine.*

The main component of the reagent matrix used in the Irritection® test is an oligomeric protein formed of 12 sub-units, with an apparent molecular weight of around 320.000 D. The proteic oligomers tend to form an auto-associative structure, forming associations bonded by non-covalent interactions. Such a matrix also contains carbohydrates, lipids and components with a low molecular weight, which, in mixtures with other components in a physiological solution, reproduce a similar structure to that of the corneous.

Il maggior costituente della matrice reagente impiegata nel test Irritection® è una proteina oligomerica costituita da 12 sub-unità, con un peso molecolare apparente di circa 320.000 D. Gli oligomeri proteici tendono ad una struttura auto-associativa, a formare associazioni legate da interazioni non-covalenti. Tale matrice contiene anche carboidrati, lipidi e componenti a basso peso molecolare, che, in miscela con gli altri componenti in una soluzione fisiologica, riproducono la struttura trasparente analoga a quella della cornea.

It has been demonstrated that when irritant agents are applied to the matrix of the Irritection® test, they produce very similar effects to those occurring *in vivo*. Furthermore, the effects of interference upon the proteic structure that interfere both with the corneous *in vivo* and with the artificial matrix of the Irritection® test can be correlated to the aggressiveness of the irritant agent, in that the nucleation of particles that make the matrix cloudy result to be proportionate to the irritant factor of the tested substance. This phenomenon can be quantified with a optical density spectrophotometer measurement performed with a custom prepared spectrophotometer. According to the Ocular Irritection® protocol, the optical density measurements are performed at 405nm (OD₄₀₅).

*E' stato dimostrato che l'applicazione di agenti irritanti applicati alla matrice del test Irritection® producono effetti simili a quelli riscontrati *in vivo*. Inoltre, gli effetti sulla interferenza sulle strutture proteiche che intervengono sia sulla cornea *in vivo* che sulla matrice artificiale del test Irritection®, sono correlabili alla aggressività dell'agente irritante, in quanto la nucleazione di particelle che intorpidiscono la matrice risulta proporzionale al potere irritante della sostanza applicata. Questo fenomeno può essere quantificato mediante misure spettrofotometriche di densità ottica mediante uno spettrofotometro perfezionato per questo uso. Le misure di densità ottica secondo il protocollo Irritection® vengono effettuate a 405nm (OD₄₀₅).*



Due to the fact that the length of time that the substances under examination are in contact with the matrix is a critical parameter, a semi-permeable membrane with controlled porosity is used which makes the identification of the maximum opacification point much easier. The point of maximum opacification is then determined by spectrophotometer.

Based on the tests performed in parallel to determine the calibration curve, it was possible to identify a direct correlation between the Draize scale (0-50) and the scale determined with the Irritection® protocol (Irritection Draize Equivalent, IDE), according to the following summary:

Poiché il tempo di contatto fra le sostanze in esame e la matrice è un parametro critico, è stato messo a punto l'impiego di una membrana semipermeabile di porosità controllata, che permette di determinare agevolmente il punto di opacizzazione massima, che risulta significativo per la correlazione con i risultati effettuati in parallelo con il Draize test su coniglio. Viene quindi determinato spettrofotograficamente il punto di massima opacizzazione. I risultati ottenuti vengono comparati dal software di Irritection® con quelli di analoghi composti standard testati in parallelo secondo i protocolli Irritection® e Draize. L'uso degli standard di calibrazione ha permesso di determinare una curva di calibrazione che correla direttamente le misure di densità ottica del modello Irritection® con i risultati ottenuti in 24 ore con il Draize test.

In base alle correlazioni ricavate dai test effettuati in parallelo per definire le curve di calibrazione, è stato possibile determinare una correlazione diretta fra la scala Draize (0-50) e la scala determinata secondo il protocollo Irritection® (Irritection Draize Equivalent, IDE), secondo il sommario seguente:

Irritection Draize Equivalent (IDE)	Predicted Ocular Irritancy Classification
0.0 - 12.5	Minimal Irritant
12.5 - 30.0	Mild Irritant
30.0 - 51.0	Moderate Irritant
51.0 - 80.0	Severe Irritant



OI001



INT.E.G.RA. S.r.l. Introduction

Interpretation of results

The optical density values elaborated by the software at the interface with a UV spectrophotometer are divided into 3 groups: **Sample values, Calibrator Values e Quality Control Values**. The Quality Control Values are formed of two samples contained within each Irritection® test kit, and which supply an irritant score in the two main windows (irritant and non irritant), with a area of tolerance. The substances have been chosen from amongst those that cause the greatest difficulty for the test so that a self-test is created. If any of the parameters results to be outside the foreseen tolerances, the test results as non-qualified, and the software does not give the elaborated results.

The Calibrators are 4 samples that are supplied with each kit and have the double function of validating the batch of the matrix/porous septum used, and of supplying the best correlation line for converting the Optical Density (OD) into an Irritant Score (IDE) for the batch of the kit used. The 4 Calibrator samples are naturally in the 4 windows, and if one of the samples does not give a result within the programmed tolerance, the test results as not-qualified and the software does not give the elaborated results.

According to the OD obtained with the Calibrators, if the Quality Controls are within tolerance the software correlates the OD of the samples with the equivalent irritant score of the Draize test. The most significant value, based on the correlated tests performed in parallel with the Draize test, proves to be the maximum value amongst those evaluated (Maximum Qualified Score).

Interpretazione dei risultati

I valori di densità ottica elaborati dal software all'interfaccia con lo spettrofotometro UV sono divisi in 3 gruppi: Sample values, Calibrator Values e Quality Control Values. I Quality Control Values sono costituiti da due campioni che accompagnano ogni singolo kit per l'esecuzione del test Irritection®, che devono fornire un determinato score irritativo nei due principali campi di lettura (Non irritante e Irritante), con un intervallo di tolleranza. Le sostanze sono state selezionate fra quelle che mettono maggiormente in difficoltà l'esecuzione del test, in modo da costituire un self-test. Se uno dei parametri risulta fuori dalle tolleranze previste, il test risulta non qualificato, ed il software non fornisce i risultati elaborati.

I Calibrators sono 4 campioni che accompagnano ogni singolo kit, ed hanno la doppia funzione di validare il lotto di matrice/setto poroso impiegati, e di fornire la retta di correlazione migliore per convertire la Densità Ottica (OD) in score irritativo (IDE) per il lotto del kit impiegato. I 4 campioni di Calibrators sono naturalmente nei 4 campi di lettura, e se uno dei campioni non fornisce i risultati nell'ambito delle tolleranze previste il test risulta non qualificato, ed il software non fornisce i risultati elaborati.

Sulla base delle OD ottenute con i Calibrators, se i Quality Controls risultano nelle tolleranze, il software correla le OD dei campioni (Samples) con lo score irritativo equivalente al Draize test. Il valore significativo, sulla base dei test correlati effettuati in parallelo con i Draize test su coniglio, risulta il valore massimo fra quelli valutati (Maximum Qualified Score).



Bibliography

1. Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377-390 (1944).
2. Kelly, C. EYETEX : An in-vitro method of predicting ocular safety. *Pharmacopeial Forum*, 4815-4824 (1989).
3. Gordon, V.C. The scientific basis of the EYETEXTM system. *ATLA* 20, 537-548 (1992).
4. Cooper, J.A. Saracci, R. and Cole, P. Describing the validity of carcinogen screening tests. *Br.J. Cancer*, 39, 87-89 (1979).
5. Scala, R.A. Theoretical approaches to validation. In : Alternative Methods in toxicology, vol.5, *In Vitro toxicology: Mechanisms and New Technology* (Ed. A.M. Goldberg) pp. 1-9, Mary Ann Liebert Publishing, New York, New York (1987).
6. Roy, T.A., Saladdin, K.A., Yang, J.J. and Gordon, V.C. Evaluation of the EYETEXTM system as screen for the eye irritancy of petroleum products. In: Alternative Methods in Toxicology, vol.8, *In Vitro Toxicology: Mechanisms and New Technology* (Ed. A.M. Goldberg) pp. 223-231, Mary Ann Liebert Publishing, New York, New York (1991).
7. Kruszewski, F.H., Hearn, L.H., Smith, K.T., Teal, J.J., Gordon, V.C. and Dickens, M.S. Application of the EYETEXTM System to the evaluation of cosmetic products and their ingredients. *ATLA*, 20, 146-163 (1992).
8. Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.G., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D. and Miller, K. A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundamental and Appl. Toxicology*, 26, 20-31 (1995).
9. Règnier, J-F., Imbert, C. and Boutonnet, J-C. Evaluation of the EYETEXTM System as a screening for the ocular irritancy of cheicla product. *ATLA*, 22. 32-50 (1994).



OI001



INT.E.G.RA. S.r.l. Introduction

To INT.E.G.RA. CUSTOMIZED SERVICE**Required Information concerning the sample:**

	Sample N.:	Sample N.:	Sample N.:	Sample N.:
Sample/s name (code, batch):				
Product/s Classification (Surfactant?):				
Solubility:				
Waste Class (when applicable):				
Storage information:				
Please mark the following information for each product, when it is "true", with X				
<i>Acidic Formulations pH < 2.0</i>				
<i>Alkaline Formulations pH > 9.0</i>				
<i>Intensely colored materials</i>				
<i>Oily and water-insoluble organic chemicals</i>				
<i>Volatile Ketones > 10%</i>				
<i>Free Nonionic Surfactants > 10%</i>				
<i>Sorbitol at concentrations > 5%</i>				
<i>Urea at concentrations > 5%</i>				
<i>Manganese Violet</i>				
<i>Aluminium Chlorohydrate</i>				
<i>Aluminium Zirconium Chlorohydrate</i>				
<i>Aluminium Chloride</i>				
<i>Titanium oxide > 10%</i>				
<i>Zinc Oxide > 10%</i>				
<i>Silver Salts contained</i>				
<i>Ferrous sulfate contained</i>				
<i>Zinc Sulfate contained</i>				

Company information:

Company Name:

VAT N.:

Complete Address:

Tel, Fax, E-mail:

Contact:

Required Sample Quantity:

Minimum: 10 ml or 1 gram of each sample

Sample Destination Address:

INT.E.G.RA. S.r.l.: 20056 Via G. Pastore, 3 Trezzo Sull'Adda (MI) Italy

Tel. +39 02.90.92.95.69 **Fax +39 02.92.09.23.82** E-mail: info@cosmeting.it WWW.cosmeting.it

(please send this information by fax or e-mail)