

Auzug aus: Verordnung (EU) 2019/1390 der Kommission vom 31. Juli 2019 zur Änderung - zwecks Anpassung an den technischen Fortschritt - des Anhangs der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 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)

## **B.71 IN-VITRO-TESTS ZUR SENSIBILISIERUNG DER HAUT IN BEZUG AUF DEN SCHLÜSSELVORGANG DER AKTIVIERUNG VON DENDRITISCHEN ZELLEN AUF DEM ADVERSE OUTCOME PATHWAY (AOP) FÜR DIE SENSIBILISIERUNG DER HAUT <sup>23</sup>**

Die vollständige Beschreibung dieser Prüfmethode wurde gestrichen. Die gleichwertige internationale Prüfmethode ist in Teil 0 Tabelle 2 aufgeführt

### ALLGEMEINE EINLEITUNG

#### **Prüfmethode auf der Grundlage des Schlüsselvorgangs der Aktivierung von dendritischen Zellen**

1. Ein Hautallergen ist gemäß Definition des Globalen Harmonisierten Systems zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS) der Vereinten Nationen (UN-GHS) (1) und der Verordnung (EU) Nr. 1272/2008 der Europäischen Union über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP) (1) ein Stoff, der bei Hautkontakt eine allergische Reaktion auslöst. Über die biologischen Schlüsselvorgänge, die der Sensibilisierung der Haut zugrunde liegen, besteht allgemeines Einverständnis. Das derzeitige Wissen über die chemischen und biologischen Mechanismen im Zusammenhang mit der Hautsensibilisierung wurde in Form eines Adverse Outcome Pathway (AOP) unter dem OECD-AOP-Programm (2), ausgehend von dem auslösenden molekularen Ereignis über die Zwischenvorgänge bis hin zur schädlichen Auswirkung auf die Gesundheit, nämlich die allergische Kontaktdermatitis, zusammengefasst. In diesem Fall ist das auslösende molekulare Ereignis (d. h. der erste Schlüsselvorgang) die kovalente Bindung von elektrophilen Stoffen an nukleophile Zentren in Hautproteinen. Der zweite Schlüsselvorgang in diesem AOP findet in den Keratinozyten statt und umfasst entzündliche Reaktionen sowie Änderungen der Genexpression in Verbindung mit spezifischen Zellsignalketten wie beispielsweise ARE (Antioxidant/Electrophile Response Element)-abhängigen Ketten. Der dritte Schlüsselvorgang ist die Aktivierung von dendritischen Zellen (DC), die normalerweise durch Expression von spezifischen Zelloberflächenmarkern, Chemokinen und Cytokinen bewertet werden. Der vierte Schlüsselvorgang ist die T-Zellaktivierung und -proliferation, die indirekt im Lokalen Lymphknotentest (LLNA) an der Maus (3) bewertet wird.
2. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 442E (2017). Sie beschreibt die In-vitro-Tests in Bezug auf Mechanismen im Rahmen des Schlüsselvorgangs der Aktivierung von dendritischen Zellen des AOP für die Sensibilisierung der Haut (2). Die Testmethode umfasst Tests, die zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren gemäß UN-GHS und CLP durchgeführt werden.

Die in dieser Prüfmethode beschriebenen Tests umfassen:

- Aktivierungstest mit humanen Zelllinien (h-CLAT)
- U937 Aktivierungstest mit Zelllinien (U-SENS<sup>TM</sup>)
- Interleukin-8 Reporter-Gen-Test (IL-8 Luc-Test)

3. Die Tests in dieser Prüfmethode und die entsprechenden OECD-TG können sich in Bezug auf das Verfahren zur Erzeugung der Daten und der gemessenen Werte unterscheiden, können aber gleichermaßen verwendet werden, um die länderspezifischen Anforderungen an die Prüfergebnisse des Schlüsselvorgangs zur Aktivierung dendritischer Zellen des AOP für die Hautsensibilisierung zu erfüllen; zugleich findet die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen auf sie Anwendung.

(1) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

### Hintergrund und Prinzipien der Tests, die in der auf den Schlüsselvorgang gestützten Prüfmethode enthalten sind

4. Die Bewertung der Hautsensibilisierung erfolgte normalerweise an Labortieren. Bei den klassischen Methoden an Meerschweinchen, dem Maximierungstest an Meerschweinchen (Guinea Pig Maximisation Test, GPMT) nach Magnusson/Kligman und dem Bühler-Test (Prüfmethode B.6) (4), werden die Induktions- und die Auslösephase der Hautsensibilisierung bewertet. Ein Test an der Maus, der Lokale Lymphknotentest (LLNA, Prüfmethode B.42) (3) und die beiden nicht radioaktiven Abwandlungen dieser Tests, LLNA: DelR (Prüfmethode B.50) (5) und LLNA: BrdU-ELISA (Prüfmethode B.51) (6), bei denen jeweils nur die Induktionsreaktion bewertet wird, haben ebenfalls an Akzeptanz gewonnen, da sie sowohl in Bezug auf den Tierschutz als auch die objektive Messung der Induktionsphase der Hautsensibilisierung Vorteile gegenüber Tests am Meerschweinchen bieten.
5. Kürzlich wurden mechanistisch basierte In-chemico- und In-vitro-Prüfmethoden in Bezug auf den ersten Schlüsselvorgang (Prüfmethode B.59; Direkt-Peptidreaktivitätstest (7)) und den zweiten Schlüsselvorgang (Prüfmethode B.60; ARE-Nrf2 Luciferase-Prüfmethode (8)) des Hautsensibilisierungs-AOP als Beitrag zur Bewertung des Gefahrenpotenzials für die Hautsensibilisierung von Chemikalien eingeführt.
6. Die in dieser Prüfmethode beschriebenen Tests quantifizieren entweder die Änderung der Expression von Zelloberflächenmarkern im Zusammenhang mit dem Aktivierungsprozess von Monozyten und dendritischen Zellen (DC) nach Exposition gegenüber Allergenen (z. B. CD54, CD86) oder die Änderungen der IL-8-Expression, einem Zytokin in Verbindung mit der Aktivierung von DC. Es wurde berichtet, dass Hautallergene die Expression von Zellmembranmarkern wie CD40, CD54, CD80, CD83 und CD86 zusätzlich zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  und mehreren Chemokine wie IL-8 (CXCL8) und CCL3 (9) (10) (11) (12) im Zusammenhang mit der DC-Aktivierung induzieren (2).
7. Da die DC-Aktivierung jedoch nur einen einzigen Schlüsselvorgang des Hautsensibilisierungs-AOP darstellt (2) (13), reichen Informationen, die mit Tests erzeugt werden, die nur Marker der DC-Aktivierung messen, möglicherweise nicht aus, um auf das Vorhandensein oder Fehlen eines Hautsensibilisierungspotenzials von Chemikalien zu schließen. Daher sollten die mit dieser Prüfmethode ermittelten Daten zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen (d. h. UN-GHS/CLP Kategorie 1) und Nichtsensibilisatoren im Rahmen integrierter Ansätze (IATA) eingesetzt und mit anderen ergänzenden Informationen, die beispielsweise aus In-vitro-Tests in Bezug auf andere Schlüsselvorgänge des Hautsensibilisierungs-AOP abgeleitet werden, sowie mit anderen Nicht-Prüfmethoden, einschließlich der Übertragung von Informationen (read across) zu chemischen Analoga (13), kombiniert werden. Beispiele zur Verwendung von Daten, die mit diesen Tests im Rahmen definierter Ansätze erzeugt wurden, d. h. standardisierter Ansätze sowohl in Bezug auf den Satz der verwendeten Informationsquellen als auch in Bezug auf das Verfahren zur Ableitung von Vorhersagen, wurden veröffentlicht (13) und können innerhalb des IATA als nützliche Elemente verwendet werden.
8. Die in dieser Prüfmethode beschriebenen Tests können alleine weder zur Einstufung von Hautallergenen in die Unterkategorien 1A und 1B gemäß Definition in UN-GHS/CLP (für Behörden, die diese zwei optionalen Unterkategorien einführen), noch zur Vorhersage des Potenzials im Rahmen von Sicherheitsbewertungsentscheidungen verwendet werden. Jedoch können mithilfe dieser Methoden erzeugte positive Ergebnisse je nach Rechtsrahmen alleine zur Einstufung einer Chemikalie in die UN-GHS/CLP-Kategorie 1 herangezogen werden.
9. Der Begriff „Prüfchemikalie“ bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was getestet <sup>(1)</sup> wird, und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit der Tests zur Prüfung von einkomponentigen Stoffen, mehrkomponentigen Stoffen und/oder Gemischen. Gegenwärtig stehen nur begrenzte Informationen über die Anwendbarkeit der Tests für mehrkomponentige Stoffe/Gemische zur Verfügung (14) (15). Die Tests sind dennoch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen und Gemischen technisch geeignet. Bevor diese Prüfmethode jedoch an einem Gemisch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, sollte geprüft werden, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefert, und wenn dem so ist, warum. <sup>(2)</sup> Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs gesetzlich vorgeschrieben ist. Zudem sollte bei mehrkomponentigen Stoffen oder Gemischen die mögliche Interferenz der zytotoxischen Komponenten mit den beobachteten Reaktionen beachtet werden.

<sup>(1)</sup> Im Juni 2013 einigte sich die Gemeinsame Tagung der OECD darauf, dass nach Möglichkeit eine einheitlichere Verwendung des Begriffs „Prüfchemikalie“ – der beschreibt, was geprüft wird – in neuen und aktualisierten OECD-Prüfleitlinien verwendet werden sollte.

<sup>(2)</sup> Dieser Satz wurde in der April 2014 WNT-Sitzung vorgeschlagen und vereinbart.

**LITERATURHINWEISE**

- (1) Vereinte Nationen (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sechste überarbeitete Auflage. New York und Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Verfügbar unter:[https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev06/06files\\_e.html](https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html).
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Verfügbar unter:[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Kapitel B.42 in diesem Anhang: Lokaler Lymphknotentest.
- (4) Kapitel B.6 in diesem Anhang: Sensibilisierung der Haut.
- (5) Kapitel B.50 in diesem Anhang: Sensibilisierung der Haut: Lokaler Lymphknotentest: DA.
- (6) Kapitel B.51 in diesem Anhang: Sensibilisierung der Haut: Lokaler Lymphknotentest: BrdU-ELISA.
- (7) Kapitel B.59 in diesem Anhang: In-chemico-Hautsensibilisierung: Direkt-Peptidreaktivitätstest (DPRA).
- (8) Kapitel B.60 in diesem Anhang: In-vitro-Hautsensibilisierung: ARE-Nrf2 Luciferase-Prüfmethode.
- (9) Steinman, RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271–96.
- (10) Caux, C., Vanbervliet B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, LL. und Banchereau, J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841–7.
- (11) Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H. und Tagami, H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031–8.

- (12) Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, ZU., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y. und Tagami, H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl<sub>2</sub> and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390–8.
- (13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter:<https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (14) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., Itagaki, H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275–284.
- (15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.

## Anlage 1

## IN-VITRO-HAUTSENSIBILISIERUNG: AKTIVIERUNGSTEST MIT HUMANEN ZELLINIEN (H-CLAT)

## AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

1. Der h-CLAT quantifiziert die Änderungen der Expression von Zelloberflächenmarkern in Zusammenhang mit dem Aktivierungsprozess von Monozyten und dendritischen Zellen (DC) (d. h. CD86 und CD54) in der humanen monozytischen Leukämie-Zelllinie THP-1 nach Exposition gegenüber Allergenen (1)(2). Die gemessenen Expressionswerte der Zelloberflächenmarker CD86 und CD54 werden dann zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren verwendet.
2. Der h-CLAT wurde in einer Validierungsstudie unter der Leitung eines Europäischen Referenzlabors für Alternativen zu Tierversuchen (EURL ECVAM) und in einer anschließenden unabhängigen Peer-Review des Wissenschaftlich Beratenden Ausschusses (ESAC) des EURL ECVAM bewertet. Unter Berücksichtigung sämtlicher verfügbarer Nachweise und Informationen von Regulierungsbehörden und Interessengruppen wurde der h-CLAT von EURL ECVAM (3) empfohlen, um im Rahmen eines IATA die Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren im Hinblick auf die Gefahreinstufung und -kennzeichnung zu unterstützen. Beispiele für die Verwendung von h-CLAT-Daten in Kombination mit anderen Informationen werden in der Literatur beschrieben (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).
3. Der h-CLAT erwies sich als übertragbar auf Labore mit Erfahrung auf dem Gebiet der Zellkulturtechniken und der Flusszytometrieanalyse. Der Grad der Reproduzierbarkeit, der bei den Tests erwartet werden kann, liegt in der Größenordnung von 80 % innerhalb von und zwischen Labors (3)(12). Die in der Validierungsstudie (13) und anderen veröffentlichten Studien (14) erzeugten Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass die Genauigkeit bei der Unterscheidung zwischen Hautallergenen (d. h. UN-GHS/CLP Kat.1) und Nichtsensibilisatoren im Vergleich zu den LLNA-Ergebnissen bei 85 % (N = 142) mit einer Empfindlichkeit von 93 % (94/101) und einer Spezifität von 66 % (27/41) liegt (gestützt auf eine erneute Analyse durch EURL ECVAM (12), wobei alle bestehenden Daten berücksichtigt und alle negativen Ergebnisse für Chemikalien mit log KOW von mehr als 3,5 wie in Abschnitt 4 beschrieben nicht berücksichtigt wurden). Bei falsch-negativen Vorhersagen mit dem h-CLAT ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass Chemikalien mit geringer bis mittlerer Hautsensibilisierungspotenz betroffen sind (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1B), als Chemikalien mit hoher Hautsensibilisierungspotenz (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1A) (4)(13)(15). Insgesamt deuten diese Informationen auf die Zweckmäßigkeit der h-CLAT-Methode für die Erkennung der Gefahr einer Hautsensibilisierung hin. Jedoch sind die Genauigkeitswerte, die hier für den h-CLAT als eigenständiger Tests angegeben werden, lediglich als Anhaltspunkte zu betrachten, da der Test in Kombination mit anderen Informationsquellen im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Bestimmungen unter Nummer 7 und 8 der Allgemeinen Einleitung betrachtet werden sollte. Darüber hinaus sollte bei der Bewertung von Prüfmethoden zur Hautsensibilisierung ohne Tierversuche beachtet werden, dass der LLNA-Test sowie andere Tierversuche die Situation bei Menschen nicht vollständig widerspiegeln.
4. Auf der Grundlage der gegenwärtig verfügbaren Daten über die h-CLAT-Methode wurde nachgewiesen, dass der Test bei Prüfchemikalien, die eine Vielzahl an organischen Funktionsgruppen, Reaktionsmechanismen, Hautsensibilisierungspotenzialen (wie in In-vivo-Studien festgestellt) und physikalisch-chemischen Eigenschaften abdecken, anwendbar ist (3)(14)(15). Die h-CLAT-Methode ist anwendbar bei Prüfchemikalien, die löslich sind oder eine stabile Dispersion (d. h. ein Kolloid oder eine Suspension, in denen die Prüfchemikalie sich nicht absetzt oder sich vom Lösungsmittel/Vehikel in verschiedene Phasen trennt) in einem geeigneten Lösungsmittel/Vehikel bilden (siehe Abschnitt 14). Prüfchemikalien mit einem log Kow von mehr als 3,5 tendieren dazu, falsch negative Ergebnisse herbeizuführen (14). Deshalb sollten negative Ergebnisse bei Prüfchemikalien mit einem log Kow von mehr als 3,5 nicht berücksichtigt werden. Positive Ergebnisse für Prüfchemikalien mit einem log Kow von mehr als 3,5 könnten jedoch noch verwendet werden, um die Identifizierung der Prüfchemikalie als Hautallergen zu unterstützen. Außerdem können Prohaptene (d. h. Stoffe, die beispielsweise über P450-Enzyme aktiviert werden müssen) und Prähaptene (d. h. Stoffe, die durch Oxidation aktiviert werden) aufgrund der begrenzten Stoffwechselfähigkeit der verwendeten Zelllinie (16) sowie der Versuchsbedingungen, insbesondere bei geringer Oxidationsgeschwindigkeit, zu negativen Ergebnissen des h-CLAT (15) führen. Fluoreszierende Prüfchemikalien können mit h-CLAT (17) bewertet werden; dennoch beeinträchtigen stark fluoreszierende Prüfchemikalien, die mit derselben Wellenlänge ausstrahlen wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder Propidiumjodid (PI), den Nachweis mittels Durchflusszytometrie und können daher nicht korrekt mithilfe von mit FITC-konjugierten Antikörpern oder PI bewertet werden. In einem solchen Fall können andere mit Fluorochrom markierte Antikörper bzw. andere Zytotoxizitätsmarker verwendet werden, solange aufgezeigt werden kann, dass sie ähnliche Ergebnisse liefern wie die mit FITC markierten Antikörper (siehe Abschnitt 24) oder PI (siehe Abschnitt 18), z. B. durch Testen der Leistungstoffe in Anlage 1–2. Angesichts der vorstehenden Ausführungen sollten negative Ergebnisse im Kontext der angegebenen Grenzen und in Verbindung mit anderen Informationsquellen im Rahmen von IATA interpretiert werden. In Fällen, in denen die Nichtanwendbarkeit der h-CLAT-Methode bei anderen spezifischen Kategorien von Prüfchemikalien nachgewiesen wird, sollte sie bei diesen spezifischen Kategorien nicht verwendet werden.

5. Die h-CLAT-Methode unterstützt, wie bereits oben erwähnt, die Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren. Er kann jedoch bei Verwendung im Rahmen von integrierten Ansätzen wie IATA möglicherweise auch zur Bewertung der Sensibilisierungspotenz beitragen (4)(5)(9). Es sind dennoch weitere Untersuchungen erforderlich, vorzugsweise auf der Grundlage von Humandaten, um herauszufinden, inwieweit die Ergebnisse des h-CLAT möglicherweise zur Potenzbewertung herangezogen werden können.
6. Definitionen sind Anlage 1.1 zu entnehmen.

#### PRINZIP DER PRÜFMETHODE

7. Die h-CLAT-Methode ist ein In-vitro-Test, der Änderungen der Expression von Zelloberflächenmarkern (d. h. CD86 und CD54) auf einer humanen monozytischen Leukämiezelllinie, THP-1-Zellen, nach einer 24-stündigen Exposition gegenüber der Prüfchemikalie quantifiziert. Diese Oberflächenmoleküle sind typische Marker der monotypischen THP-1-Aktivierung und können die DC-Aktivierung eventuell nachahmen, die eine kritische Rolle bei der T-Zellen-vorbehandlung spielt. Die Änderungen der Expression von Oberflächenmarkern werden mittels Durchflusszytometrie nach Zellfärbung mit Antikörpern, die mit Fluorochrom markiert wurden, gemessen. Die Zytotoxizitätsmessung wird ebenfalls zur gleichen Zeit durchgeführt, um zu beurteilen, ob die Hochregulierung der Expression von Oberflächenmarkern bei Konzentrationen unterhalb des zytotoxischen Werts auftritt. Die relative Fluoreszenzintensität der Oberflächenmarker im Vergleich zur Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle wird berechnet und im Vorhersagemodell verwendet (siehe 26), um die Unterscheidung zwischen Allergenen und Nichtsensibilisatoren zu unterstützen.

#### NACHWEIS DER KOMPETENZ

8. Vor der routinemäßigen Verwendung des unter dieser Anlage zur Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Laboratorien ihre technische Kompetenz anhand der zehn in Anlage 1.2 aufgeführten Leistungsstoffe nachweisen. Darüber hinaus sollten Prüfungsnutzer eine historische Datenbank der mit den Reaktivitätsprüfungen (siehe Abschnitt 11) und mit den positiven sowie Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen (siehe Abschnitte 20–22) erzeugten Daten pflegen und diese Daten nutzen, um zu bestätigen, dass die Reproduzierbarkeit der Prüfung in ihrem Labor im Lauf der Zeit aufrechterhalten wird.

#### VERFAHREN

9. Diese Prüfmethode basiert auf dem h-CLAT-DataBase-Dienst für alternative Methoden zur Durchführung von Tierversuchen (DB-ALM) Protokoll Nr. 158 (18), das für die vom EURL ECVAM koordinierte Validierungsstudie verwendet wurde. Es wird empfohlen, dieses Protokoll bei der Durchführung und Anwendung der h-CLAT-Methode im Labor zugrunde zu legen. Nachfolgend werden die wichtigsten Komponenten und Verfahren der h-CLAT-Methode beschrieben, die zwei Schritte umfasst: *Test zur Dosisfindung* und *CD86/CD54-Expressionsmessung*.

#### Vorbereitung der Zellen

10. Bei Ausführung der h-CLAT-Methode sollte die humane monozytische Leukämie-Zelllinie THP-1 verwendet werden. Es wird empfohlen, dass Zellen (TIB-202™) aus einer gut qualifizierten Zellbank wie der American Type Culture Collection entnommen werden.
11. THP-1-Zellen werden bei 37°C unter 5 % CO<sub>2</sub> und einer befeuchteten Atmosphäre in einem mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS), 0,05 mM 2-Mercaptoethanol, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin angereicherten RPMI-1640-Medium kultiviert. Die Verwendung von Penicillin und Streptomycin im Kulturmedium kann vermieden werden. In einem solchen Fall sollten Benutzer jedoch verifizieren, dass das Nichtvorhandensein von Antibiotika im Kulturmedium keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat, beispielsweise durch Testen der in Anlage 1.2 aufgeführten Leistungsstoffe. Um das Kontaminationsrisiko zu minimieren, sollten bewährte Zellkulturpraktiken auf jeden Fall unabhängig vom Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Antibiotika im Zellkulturmedium befolgt werden. THP-1-Zellen werden regelmäßig alle 2–3 Tage bei einer Dichte von 0,1 bis 0,2 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml ausgesät. Es sollten Zelldichten von 0,1 bis 1,0 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml gewahrt werden. Vor ihrer Verwendung zu Testzwecken sollten die Zellen qualifiziert werden, indem ein Reaktivitätstest durchgeführt wird. Der Reaktivitätstest der Zellen sollte mithilfe der positiven Kontrollen, 2,4-Dinitrochlorbenzol (DNCB) (CAS Nr. 97-00-7, ≥99 % Reinheit) und Nickelsulfat (NiSO<sub>4</sub>) (CAS Nr. 10101-97-0, ≥99 % Reinheit) und der negativen Kontrolle, Milchsäure (LA) (CAS Nr. 50-21-5, ≥85 % Reinheit) zwei Wochen nach dem Auftauen durchgeführt werden. DNCB und NiSO<sub>4</sub> sollten eine positive Reaktion auf CD86- und CD54-Zelloberflächenmarker ergeben und LA sollte eine negative Reaktion auf CD86- und CD54-Zelloberflächenmarker ergeben. Nur die Zellen, welche den Reaktivitätstest bestanden haben, dürfen für den Test verwendet werden. Zellen können bis zu zwei Monate nach dem Auftauen gewonnen werden. Die Passagenanzahl sollte 30 nicht übersteigen. Der Reaktivitätstest sollte gemäß den in den Abschnitten 20–24 beschriebenen Verfahren durchgeführt werden.

12. Zur Prüfung werden die THP-1-Zellen bei einer Dichte von entweder  $0,1 \times 10^6$  Zellen/ml oder  $0,2 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät und in Kulturkolben 72 bzw. 48 Stunden lang vorgezchtet. Es ist wichtig, dass die Zelldichte im Kulturkolben direkt nach dem Vorkulturzeitraum bei jedem Versuch so konstant wie möglich ist (indem eine der zwei oben beschriebenen Vorkulturbedingungen angewandt wird), da die Zelldichte im Kulturkolben direkt nach der Vorkultur die von Allergenen induzierte CD86/CD54-Expression beeinträchtigen könnte (19). Am Tag des Tests werden die Zellen, die aus dem Kulturkolben geerntet wurden, mit einem frischen Kulturmedium mit  $2 \times 10^6$  Zellen/ml neu angesetzt. Dann werden die Zellen in eine flache Platte mit 24 Mulden (500  $\mu$ l,  $1 \times 10^6$  Zellen/Mulde) oder eine flache Platte mit 96 Mulden (80  $\mu$ l,  $1,6 \times 10^5$  Zellen/Mulde) verteilt.

### Test zur Dosisfindung

13. Ein Test zur Dosisfindung wird durchgeführt, um CV75 zu bestimmen. Dies ist die Prüfchemikalienkonzentration, die im Vergleich zur Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle zu einer Zellviabilität (CV) von 75 % führt. Der CV75-Wert wird verwendet, um die Konzentration der Prüfchemikalien für die CD86/CD54-Expressionsmessung zu bestimmen (siehe Abschnitte 20–24).

#### Vorbereitung der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

14. Die Prüfchemikalien sowie die Kontrollstoffe werden am Tag des Tests vorbereitet. Bei der h-CLAT-Method werden die Prüfchemikalien in Kochsalzlösung oder einem Medium, als erste Lösungsmittel-/Vehikelooptionen, oder Dimethylsulfoxid (DMSO,  $\geq 99$  % Reinheit), als zweite Lösungsmittel-/Vehikelooption, aufgelöst oder stabil verteilt (siehe auch Abschnitt 4), falls die Prüfchemikalie in den zwei zuvor genannten Lösungsmitteln/Vehikeln mit endgültigen Konzentrationen von 100 mg/ml (in Kochsalzlösung oder Medium) oder 500 mg/ml (in DMSO) nicht löslich ist oder keine stabile Verteilung ausbildet. Andere als die oben beschriebenen Lösungsmittel/Vehikel können verwendet werden, wenn eine ausreichende wissenschaftliche Begründung gegeben wird. Die Stabilität der Prüfchemikalie im endgültigen Lösungsmittel/Vehikel sollte berücksichtigt werden.
15. Ausgehend von den 100 mg/ml- (in Kochsalzlösung oder Medium) oder 500 mg/ml- (in DMSO) Stammlösungen der Prüfchemikalien sollten die folgenden Verdünnungsschritte durchgeführt werden:
- Für Kochsalzlösung oder Medium als Lösungsmittel/Vehikel: Acht Stammlösungen (acht Konzentrationen) werden nach zweifachen seriellen Verdünnungen mithilfe des entsprechenden Lösungsmittels/Vehikels vorbereitet. Diese Stammlösungen werden dann im Kulturmedium 50-fach weiter verdünnt (Arbeitslösungen). Wenn die obere endgültige Konzentration in der Platte von 1 000  $\mu$ g/ml nicht toxisch ist, sollte die maximale Konzentration erneut bestimmt werden, indem eine neue Zytotoxizitätsprüfung durchgeführt wird. Die endgültige Konzentration in der Platte sollte 5 000  $\mu$ g/ml für Prüfchemikalien, die in Kochsalzlösung oder einem Medium gelöst oder stabil verteilt wurden, nicht überschreiten.
  - Für DMSO als Lösungsmittel/Vehikel: Acht Stammlösungen (acht Konzentrationen) werden nach zweifachen seriellen Verdünnungen mithilfe des entsprechenden Lösungsmittels/Vehikels vorbereitet. Diese Stammlösungen werden dann im Kulturmedium 250-fach weiter verdünnt (Arbeitslösungen). Die endgültige Konzentration in der Platte sollte 1 000  $\mu$ g/ml nicht überschreiten, auch wenn die Konzentration nicht toxisch ist.

Die Arbeitslösungen werden schließlich zur Exposition verwendet, indem eine gleiche Menge an Arbeitslösung zum Volumen der THP-1-Zellsuspension in der Platte hinzugefügt wird (siehe auch Abschnitt 17), um eine weitere zweifache Verdünnung zu erhalten (normalerweise beträgt der endgültige Bereich an Konzentrationen in der Platte 7,81–1 000  $\mu$ g/ml).

16. Die bei der h-CLAT-Methode verwendete Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle ist das Kulturmedium (für mit Medium oder Kochsalzlösung löslich gemachte oder stabil verteilte (siehe Abschnitt 4) Prüfchemikalien) oder DMSO (für in DMSO löslich gemachte oder stabil verteilte Prüfchemikalien), die bei einer einzigen endgültigen Konzentration in der Platte von 0,2 % geprüft wurden. Hier wird dasselbe Verdünnungsverfahren verwendet, das für Arbeitslösungen in Abschnitt 15 beschrieben wird.

#### Applikation der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

17. Das Kulturmedium oder die Arbeitslösungen, die in den Abschnitten 15 und 16 beschrieben werden, werden 1:1 (v/v) mit den in der flachen Platte mit 24 oder 96 Mulden vorbereiteten Zellsuspensionen gemischt (siehe Abschnitt 12). Die behandelten Platten werden dann  $24 \pm 0,5$  Stunden bei 37°C unter 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es ist darauf zu achten, dass eine Verdunstung der flüchtigen Prüfchemikalien sowie eine Kreuzkontamination zwischen Mulden durch die Prüfchemikalien vermieden werden, indem die Platte beispielsweise vor der Inkubation mit den Prüfchemikalien versiegelt wird (20).

### Färben mit Propidiumjodid (PI)

18. Nach einer Expositionszeit von  $24 \pm 0,5$  Stunden werden die Zellen in Probenröhrchen übertragen und durch Zentrifugierung gesammelt. Die Überstände werden entsorgt und die verbleibenden Zellen werden mit 200  $\mu\text{l}$  (im Falle von 96 Mulden) oder 600  $\mu\text{l}$  (im Falle von 24 Mulden) einer mit Phosphat gepufferten Kochsalzlösung mit 0,1 % Rinderserum-Albumin (Färbepuffer) resuspendiert. 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension werden in eine Platte mit gewölbtem Boden und 96 Mulden (im Falle von 96 Mulden) oder ein Mikroröhrchen (im Falle von 24 Mulden) gegeben und zweimal mit 200  $\mu\text{l}$  (im Falle von 96 Mulden) oder 600  $\mu\text{l}$  (im Falle von 24 Mulden) Färbepuffer gewaschen. Schließlich werden die Zellen in Färbepuffer (z. B. 400  $\mu\text{l}$ ) resuspendiert und es wird PI-Lösung (z. B. 20  $\mu\text{l}$ ) hinzugefügt (zum Beispiel ist die endgültige Konzentration von PI 0,625  $\mu\text{g/ml}$ ). Andere Zytotoxizitätsmarker wie 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), Trypan blau oder andere können verwendet werden, wenn gezeigt werden kann, dass die alternativen Farbstoffe ähnliche Ergebnisse liefern wie PI, zum Beispiel durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 1.2.

### Zytotoxizitätsmessung anhand von Durchflusszytometrie und Schätzung von CV75-Wert

19. Die PI-Aufnahme wird anhand der Durchflusszytometrie mit dem Aufnahmekanal FL-3 analysiert. Es werden insgesamt 10 000 lebende Zellen (PI negativ) aufgenommen. Die Zellviabilität kann anhand der folgenden Gleichung über das Zytometeranalyseprogramm berechnet werden. Wenn die Zellviabilität gering ist, sollten bis zu 30 000 Zellen einschließlich toter Zellen aufgenommen werden. Alternativ können die Daten eine Minute nach der Einleitung der Analyse aufgenommen werden.

$$\text{Zellviabilität} = \frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Gesamtzahl der aufgenommenen Zellen}} \times 100$$

Der CV75-Wert (siehe Abschnitt 13), d. h. eine Konzentration, die 75 % des THP-1-Zellüberlebens (25 % Zytotoxizität) zeigt, wird anhand der log-linearen Interpolation mit der folgenden Gleichung berechnet:

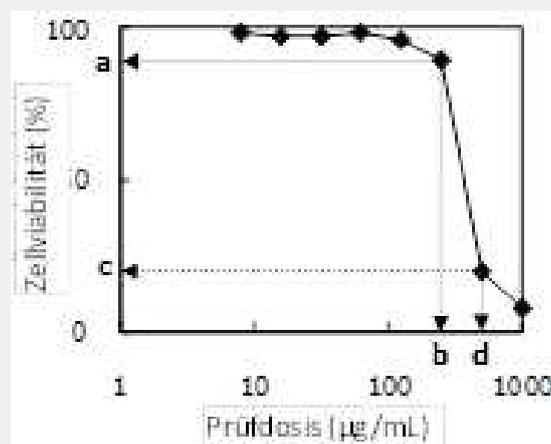
$$\text{Log CV75} = \frac{(75 - c) \times \text{Log}(b) - (75 - a) \times \text{Log}(d)}{a - c}$$

Dabei gilt:

a ist der Mindestwert der Zellviabilität über 75 %

c ist der Höchstwert der Zellviabilität unter 75 %

b und d sind die Konzentrationen, die den Wert der Zellviabilität a bzw. c zeigen



Weitere Ansätze zur Ableitung von CV75 können angewandt werden, solange demonstriert wird, dass dies keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat (z. B. durch Testen der Leistungsstoffe).

## CD86/CD54-Expressionsmessung

### Vorbereitung der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

20. Das geeignete Lösungsmittel/Vehikel (Kochsalzlösung, Medium oder DMSO; siehe Abschnitt 14) wird verwendet, um die Prüfchemikalien zu lösen oder stabil zu verteilen. Die Prüfchemikalien werden zuerst auf die Konzentration verdünnt, die dem 100-fachen (für Kochsalzlösung oder Medium) oder 500-fachen (für DMSO) von  $1,2 \times CV75$  entspricht, der im *Test zur Dosisfindung* bestimmt wurde (siehe Abschnitt 19). Wenn der CV75 nicht bestimmt werden kann (d. h. wenn keine ausreichende Zytotoxizität im *Test zur Dosisfindung* beobachtet werden kann), sollte die höchste lösliche oder stabil verteilte Konzentration der Prüfchemikalie, die mit jedem Lösungsmittel/Vehikel vorbereitet wird, als Ausgangskonzentration verwendet werden. Bitte beachten Sie, dass die endgültige Konzentration in der Platte 5 000  $\mu\text{g/ml}$  (im Falle von Kochsalzlösung oder Medium) oder 1 000  $\mu\text{g/ml}$  (im Falle von DMSO) nicht überschreiten sollte. Dann werden 1,2-fache serielle Verdünnungen mit dem entsprechenden Lösungsmittel/Vehikel hergestellt, um die Stammlösungen zu erhalten (acht Konzentrationen von  $100 \times 1,2 \times CV75$  bis  $100 \times 0,335 \times CV75$  (für Kochsalzlösung oder Medium) oder von  $500 \times 1,2 \times CV75$  bis  $500 \times 0,335 \times CV75$  (für DMSO)), die in der h-CLAT-Methode geprüft werden sollen (siehe DB-ALM-Protokoll Nr. 158 für ein Beispiel eines Dosierungsschemas). Die Stammlösungen werden dann im Kulturmedium 50-fach (für Kochsalzlösung oder Medium) oder 250-fach (für DMSO) weiter verdünnt (Arbeitslösungen). Diese Arbeitslösungen werden schließlich für die Exposition mit einem weiteren endgültigen zweifachen Verdünnungsfaktor in der Platte verwendet. Wenn die Ergebnisse die in den Abschnitten 29 und 30 beschriebenen Akzeptanzkriterien zur Zellviabilität nicht erfüllen, kann der *Test zur Dosisfindung* wiederholt werden, um einen präziseren CV75 zu bestimmen. Bitte beachten Sie, dass nur Platten mit 24 Mulden für die CD86/CD54-Expressionsmessung verwendet werden können.
21. Die Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle wird wie in Abschnitt 16 beschrieben vorbereitet. Die bei der h-CLAT-Methode verwendete Positivkontrolle ist DNCB (siehe Abschnitt 11), für die Stammlösungen in DMSO vorbereitet und wie für die Stammlösungen in Abschnitt 20 beschrieben verdünnt werden. DNCB sollte als Positivkontrolle für die CD86/CD54-Expressionsmessung mit einer endgültigen Konzentration in der Platte verwendet werden (normalerweise 4,0  $\mu\text{g/ml}$ ). Um eine Konzentration von 4,0  $\mu\text{g/ml}$  DNCB in der Platte zu erhalten, wird eine Stammlösung von 2 mg/ml DNCB in DMSO vorbereitet und weiter 250-fach mit dem Kulturmedium in eine Arbeitslösung von 8  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt. Alternativ könnte auch der CV75 von DNCB, der in jeder Prüfeinrichtung bestimmt wird, als Positivkontrollkonzentration verwendet werden. Andere geeignete Positivkontrollen können verwendet werden, sofern historische Daten für die Ableitung vergleichbarer Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf zur Verfügung stehen. Bei Positivkontrollen sollte die endgültige Einzelkonzentration in der Platte 5 000  $\mu\text{g/ml}$  (im Falle von Kochsalzlösung oder Medium) oder 1 000  $\mu\text{g/ml}$  (im Falle von DMSO) nicht überschreiten. Die Durchlaufakzeptanzkriterien entsprechen denen, die für die Prüfchemikalien beschrieben werden (siehe Abschnitt 29), ausgenommen für das letzte Akzeptanzkriterium, da die Positivkontrolle mit einer einzelnen Konzentration geprüft wird.

### Applikation der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

22. Für jede Prüfchemikalie und jeden Kontrollstoff ist ein Experiment erforderlich, um eine Vorhersage zu ermitteln. Jedes Experiment besteht aus mindestens zwei unabhängigen Durchläufen für die CD86/CD54-Expressionsmessung (siehe Abschnitte 26–28). Jeder unabhängige Durchlauf wird an einem anderen Tag bzw. am selben Tag durchgeführt, vorausgesetzt, dass für jeden Durchlauf: a) unabhängige frische Stammlösungen und Arbeitslösungen der Prüfchemikalie und Antikörperlösungen vorbereitet werden und b) unabhängig geerntete Zellen verwendet werden (d. h. Zellen, die aus verschiedenen Kulturkolben entnommen werden); Zellen können jedoch aus derselben Passage stammen. Prüfchemikalien und Kontrollstoffe, die als Arbeitslösungen (500  $\mu\text{l}$ ) vorbereitet wurden, werden mit 500  $\mu\text{l}$  der suspensierten Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen) im Verhältnis von 1:1 gemischt und die Zellen werden  $24 \pm 0,5$  Stunden wie in den Abschnitten 20 und 21 beschrieben inkubiert. In jedem Durchlauf reicht ein einziges Replikat für jede Konzentration der Prüfchemikalie und des Kontrollstoffs aus, da eine Vorhersage in mindestens zwei unabhängigen Durchläufen ermittelt wird.

### Zellfärbung und Analyse

23. Nach einer Expositionsdauer von mindestens  $24 \pm 0,5$  Stunden werden die Zellen von einer Platte mit 24 Mulden in Probenröhrchen gegeben, mithilfe von Zentrifugierung gesammelt und dann zweimal mit 1 ml Färbepuffer gewaschen (wenn erforderlich können zusätzliche Waschschritte durchgeführt werden). Nach dem Waschen werden die Zellen mit 600  $\mu\text{l}$  Blockierungslösung blockiert (Färbepuffer mit 0,01 % (w/v) Globulin (Cohn-Fraktion II, III, human; SIGMA, #G2388-10G oder ähnliches)) und bei 4°C 15 Minuten lang inkubiert. Nach der Blockierung werden die Zellen in drei Aliquote von je 180  $\mu\text{l}$  in eine Platte mit gewölbtem Boden und 96 Mulden oder ein Mikroröhrchen aufgeteilt.
24. Nach der Zentrifugierung werden die Zellen mit 50  $\mu\text{l}$  der mit FITC markierten anti-CD86-, anti-CD54- oder Maus-IgG1-Antikörper (Isotyp) bei 4°C 30 Minuten lang gefärbt. Die im h-CLAT DB-ALM Protokoll Nr. 158 (18) beschriebenen Antikörper sollten verwendet werden, indem sie 3:25 v/v (für CD86 (BD-PharMingen, #555657; Klon: Fun-1)) oder 3:50 v/v (für CD54 (DAKO, #F7143; Klon: 6.5B5) und IgG1 (DAKO, #X0927)) mit Färbepuffer verdünnt werden. Diese Antikörperverdünnungsfaktoren wurden von den Entwicklern des Tests als diejenigen definiert, die den besten Rauschabstand bieten. Nach Erfahrung der Testentwickler ist die Fluoreszenzintensität der

Antikörper normalerweise zwischen verschiedenen Chargen konsistent. Benutzer können jedoch erwägen, die Antikörper unter den Bedingungen im eigenen Labor zu titrieren, um die besten Gebrauchskonzentrationen zu definieren. Andere mit Fluorochrom markierte anti-CD86- und/oder anti-CD54-Antikörper können verwendet werden, wenn gezeigt werden kann, dass sie ähnliche Ergebnisse wie mit FITC konjugierte Antikörper liefern, beispielsweise durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 1.2. Anzumerken ist, dass die Änderung des Klons oder des Lieferanten der Antikörper, wie dies im h-CLAT DB-ALM Protokoll Nr. 158 (18) beschrieben wird, die Ergebnisse beeinträchtigen kann. Nach dem zwei- oder mehrfachen Waschen mit 150 µl Färbepuffer werden die Zellen in Färbepuffer resuspendiert (z. B. 400 µl) und die PI-Lösung (z. B. 20 µl, um eine endgültige Konzentration von 0,625 µg/ml zu erhalten) oder eine andere Zytotoxizitätsmarkerlösung (siehe Abschnitt 18) wird hinzugefügt. Die Expressionswerte von CD86 und CD54 sowie die Zellviabilität werden mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

#### DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

##### Datenauswertung

25. Die Expression von CD86 und CD54 wird mithilfe der Durchflusszytometrie mit dem Aufnahmekanal FL-1 analysiert. Auf der Grundlage der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) werden die relative Fluoreszenzintensität (RFI) von CD86 und CD54 für Positivkontrollzellen (ctrl) und chemisch behandelte Zellen nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$RFI = \frac{(MFI \text{ chemisch behandelte Zelle} - MFI \text{ chemisch behandelte Isotypkontrollzellen})}{(MFI \text{ mit Lösungsm./Vehikel beh. Kontrollz.} - MFI \text{ mit Lösungsm. - Vehikel beh./Isotypkontrollz.})} \times 100$$

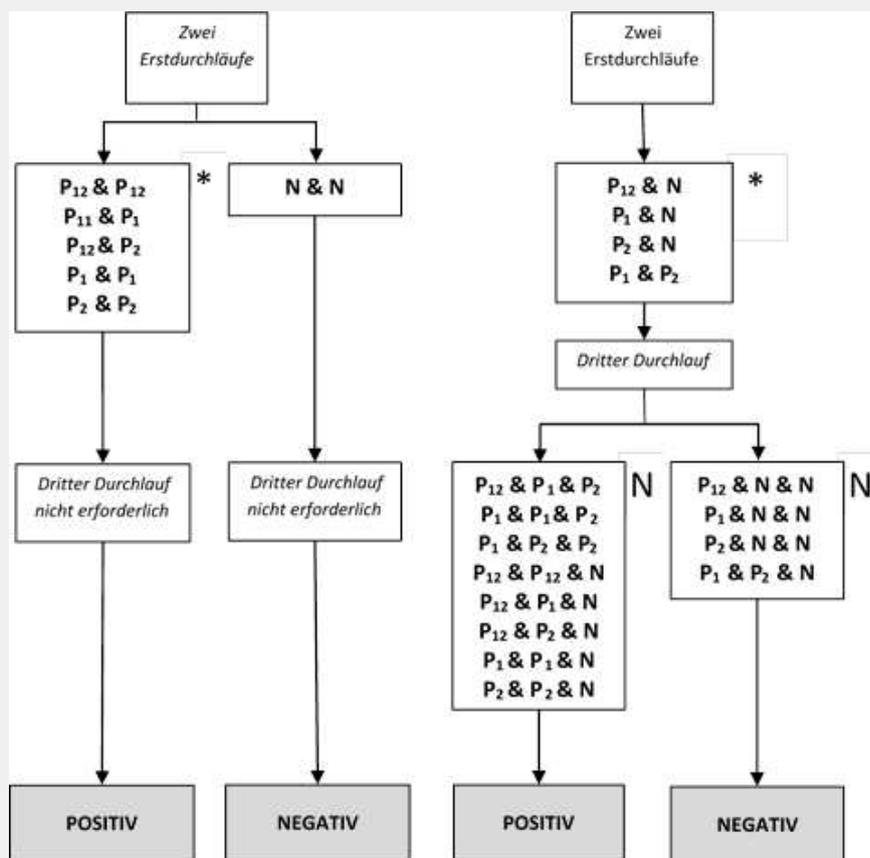
Die Zellviabilität aus den Isotypkontrollzellen (ctrl) (die mit Maus-IgG1-Antikörpern (Isotyp) gefärbt werden) wird ebenfalls nach der in Abschnitt 19 beschriebenen Gleichung berechnet.

##### Vorhersagemodell

26. Bei der CD86/CD54-Expressionsmessung wird jede Prüfchemikalie in mindestens zwei unabhängigen Durchläufen geprüft, um eine einzige Vorhersage abzuleiten (POSITIV oder NEGATIV). Eine h-CLAT-Vorhersage gilt als POSITIV, wenn mindestens eine der folgenden Bedingungen in 2 von 2 oder in mindestens 2 von 3 unabhängigen Durchläufen erfüllt ist, andernfalls wird die h-CLAT-Vorhersage als NEGATIV angesehen (Abbildung 1):

- Die RFI von CD86 ist bei jeder geprüften Konzentration gleich oder größer als 150 % (mit einer Zellviabilität  $\geq 50$  %);
- die RFI von CD54 ist bei jeder geprüften Konzentration gleich oder größer als 200 % (mit einer Zellviabilität  $\geq 50$  %).

27. Auf dieser Grundlage ist die h-CLAT-Vorhersage als POSITIV anzusehen, wenn die ersten zwei Durchläufe positiv für CD86 und/oder positiv für CD54 waren; ein dritter Durchlauf ist dann nicht mehr erforderlich. Analog ist die h-CLAT-Vorhersage als NEGATIV anzusehen (unter angemessener Berücksichtigung der Bestimmungen in Abschnitt 30), wenn die ersten zwei Durchläufe für beide Marker negativ sind; ein dritter Durchlauf ist dann nicht mehr erforderlich. Wenn die ersten zwei Durchläufe jedoch für mindestens einen der Marker nicht konkordant ist (CD54 oder CD86), dann ist ein dritter Durchlauf erforderlich und die endgültige Vorhersage basiert auf dem Mehrheitsergebnis der drei individuellen Durchläufe (d. h. 2 von 3). In dieser Hinsicht ist zu beachten, dass ein dritter Durchlauf erforderlich ist, wenn zwei unabhängige Durchläufe durchgeführt werden und einer nur für CD86 (nachfolgend „P<sub>1</sub>“ genannt) und der andere nur für CD54 (nachfolgend „P<sub>2</sub>“ genannt) positiv ist. Wenn dieser dritte Durchlauf für beide Marker negativ ist (nachfolgend „N“ genannt), dann wird die h-CLAT-Vorhersage als NEGATIV angesehen. Wenn der dritte Durchlauf andererseits für einen der Marker (P<sub>1</sub> oder P<sub>2</sub>) oder für beide Marker (nachfolgend „P<sub>12</sub>“ genannt) positiv ist, dann ist die h-CLAT-Vorhersage als POSITIV anzusehen.



**Abb. 1:** Bei der h-CLAT-Methode verwendetes Vorhersagemodell. Eine h-CLAT-Vorhersage sollte im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Nummern 7 und 8 der Allgemeinen Einleitung in Betracht gezogen werden.

P<sub>1</sub>: Durchlauf mit nur CD86 positiv; P<sub>2</sub>: Durchlauf mit nur CD54 positiv; P<sub>12</sub>: Durchlauf mit CD86 und CD54 positiv; N: Durchlauf mit weder CD86 noch CD54 positiv.

\*Die Kästchen zeigen die relevanten Kombinationen der Ergebnisse aus den ersten beiden Durchläufen unabhängig von der Reihenfolge, in der sie ermittelt wurden.

#Die Kästchen zeigen die relevanten Kombinationen der Ergebnisse aus den drei Durchläufen auf der Grundlage der Ergebnisse aus den ersten zwei Durchläufen, wie im obigen Kästchen dargestellt, aber spiegeln nicht die Reihenfolge wider, in der sie ermittelt wurden.

28. Für die Prüfchemikalien, die mit h-CLAT als POSITIV vorhergesehen wurden, können optional zwei effektive Konzentrationswerte (EC) bestimmt werden, EC150 für CD86 und EC200 für CD54, d. h. die Konzentration, bei der die Prüfchemikalien eine RFI von 150 bzw. 200 induzierten. Diese EC-Werte können jedoch bei Verwendung im Rahmen von integrierten Ansätzen wie IATA (4) (5) (6) (7) (8) möglicherweise auch zur Bewertung der Sensibilisierungspotenz beitragen (9). Sie können mithilfe der folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}] \times (A_{conc} - B_{conc})$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}] \times (A_{conc} - B_{conc})$$

Dabei gilt:

A<sub>conc</sub> ist die niedrigste Konzentration in µg/ml mit RFI > 150 (CD86) oder 200 (CD54)

B<sub>conc</sub> ist die höchste Konzentration in µg/ml mit RFI < 150 (CD86) oder 200 (CD54)

A<sub>RFI</sub> ist die RFI bei der niedrigsten Konzentration mit RFI > 150 (CD86) oder 200 (CD54)

B<sub>RFI</sub> ist die RFI bei der höchsten Konzentration mit RFI > 150 (CD86) oder 200 (CD54)

Zum Zwecke der präziseren Ableitung der EC150- und EC200-Werte können drei unabhängige Durchläufe für die CD86/CD54-Expressionsmessung erforderlich sein. Die endgültigen EC150- und EC200-Werte werden dann als Mittelwert der aus den drei unabhängigen Durchläufen berechneten ECs bestimmt. Wenn nur zwei der drei unabhängigen Durchläufe die Kriterien für Positivität (siehe Abschnitte 26–27) erfüllen, wird der höhere EC150 oder EC200 der zwei berechneten Werte übernommen.

### Akzeptanzkriterien

29. Bei der Verwendung der h-CLAT-Methode (22) (27) sollten die folgenden Akzeptanzkriterien erfüllt werden.
- Die Zellviabilitäten der Medium- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen sollten höher als 90 % sein.
  - Bei der Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle sollten die RFI-Werte von CD86 und CD54 die positiven Kriterien nicht überschreiten (CD86 RFI  $\geq$  150 % und CD54 RFI  $\geq$  200 %). Die RFI-Werte der Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle werden berechnet, indem die in Abschnitt 25 beschriebene Formel verwendet wird („MFI der Chemikalie“ sollte durch „MFI des Lösungsmittels/Vehikels“ ersetzt werden und „MFI des Lösungsmittels/Vehikels“ sollte durch „MFI der (Medium-)Kontrolle“ ersetzt werden).
  - Bei den Medium- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen sollte das MFI-Verhältnis von CD86 und CD54 zur Isotypkontrolle  $>105$  % betragen.
  - Bei der Positivkontrolle (DNCB) sollten die RFI-Werte von CD86 und CD54 die Positivkriterien (CD86 RFI  $\geq$  150 und CD54 RFI  $\geq$  200) erfüllen und die Zellviabilität sollte mehr als 50 % betragen.
  - Für die Prüfchemikalie sollte die Zellviabilität in mindestens vier geprüften Konzentrationen in jedem Durchlauf mehr als 50 % betragen.
30. Negative Ergebnisse sind nur für Prüfchemikalien mit einer Zellviabilität von weniger als 90 % bei der höchsten geprüften Konzentration zulässig (d. h.  $1,2 \times CV75$  gemäß dem in Abschnitt 20 beschriebenen seriellen Verdünnungsschema). Wenn die Zellviabilität bei  $1,2 \times CV75$  90 % oder mehr beträgt, sollte das negative Ergebnis verworfen werden. In einem solchen Fall wird empfohlen, die Dosiswahl durch Wiederholung der CV75-Bestimmung zu präzisieren. Es sollte beachtet werden, dass bei der Verwendung von 5 000  $\mu\text{g/ml}$  in Kochsalzlösung (oder Medium oder anderen Lösungsmitteln/Vehikeln), 1 000  $\mu\text{g/ml}$  in DMSO oder der höchsten löslichen Konzentration als maximale Prüfkonzentration einer Prüfchemikalie ein negatives Ergebnis auch dann akzeptabel ist, wenn die Zellviabilität über 90 % liegt.

### Prüfbericht

31. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten.

#### *Prüfchemikalie*

Einkomponentiger Stoff:

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
- physikalisches Erscheinungsbild, log Kow, Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in DMSO, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern verfügbar;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

#### Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoff und Gemisch

- Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Komponenten, soweit verfügbar;
- physikalisches Erscheinungsbild, Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in DMSO und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern verfügbar;
- Molekulargewicht oder scheinbares Molekulargewicht im Fall von Gemischen/ Polymeren mit bekannter Zusammensetzung oder andere für die Durchführung der Studie relevante Informationen;
- Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

#### Kontrollen

##### Positivkontrolle

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
- physikalisches Erscheinungsbild,  $\log K_{ow}$ , Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in DMSO, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern verfügbar und falls zutreffend;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- ggf. Verweis auf historische Ergebnisse von Positivkontrollen, die geeignete Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf dokumentieren.

##### Negativ- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle:

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Aussehen, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern andere Kontroll-Lösungsmittel/Vehikel als die in der Prüfrichtlinie genannten verwendet werden und soweit verfügbar;
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

*Prüfbedingungen:*

- Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;
- Beschreibung des verwendeten Tests;
- verwendete Zelllinie, zugehörige Lagerbedingungen und Quelle (z. B. Einrichtung, von der sie gewonnen wurden);
- die verwendete Durchflusszytometrie (z. B. Modell), einschließlich der Geräteeinstellungen, Globulin, Antikörper und verwendeten Zytotoxizitätsmarker;
- das angewandte Verfahren zum Nachweis der Kompetenz des Labors bei der Durchführung des Tests durch Prüfen der Leistungsstoffe) und das angewandte Verfahren zum Nachweis der reproduzierbaren Leistung des Tests im Zeitverlauf, z. B. historische Kontrolldaten und/oder Daten zu historischen Reaktivitätstests.

*Validitätskriterien*

- Zellviabilität, MFI- und RFI-Werte aus der Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle im Vergleich zu den Validitätsbereichen;
- Zellviabilität und RFI-Werte aus der Positivkontrolle im Vergleich zu den Validitätsbereichen;
- Zellviabilität aller geprüften Konzentrationen der geprüften Chemikalie.

*Prüfverfahren*

- Anzahl der vorgenommenen Durchläufe;
- Konzentrationen der Prüfchemikalie, Applikationen und angewandte Expositionsdauer (falls von den Empfehlungen abweichend)
- Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren.

*Ergebnisse*

- Tabellierung der Daten, einschließlich CV75 (falls anwendbar), individueller geometrischer MFI, RFI, Zellviabilitätswerte, EC150/EC200-Werte (falls anwendbar) für die Prüfchemikalie und für die Positivkontrolle in jedem Durchlauf und eine Anzeige der Einstufung der Prüfchemikalie gemäß dem Vorhersagemodell;
- Beschreibung etwaiger sonstiger relevanter Beobachtungen, falls zutreffend.

*Erörterung der Ergebnisse*

- Erörterung der anhand der h-CLAT-Methode erhaltenen Ergebnisse;
- Analyse der Prüfergebnisse im Rahmen eines IATA, sofern sonstige relevante Informationen vorliegen.

*Schlussfolgerungen*

**LITERATURHINWEISE**

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). 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* 20, 767–773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428–437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Verfügbar unter:<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318–1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333–1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489–504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371–379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337–351.
- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355–2383.

- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol*. DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150–60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Verfügbar unter:<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Verfügbar unter:<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599–609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275–284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683–1969.
- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6<sup>th</sup> report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. *AATEX* 15, 81–88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23ff. Verfügbar unter:<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. *AATEX* 13, 70–82.

- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7<sup>th</sup> report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89–96.
- (21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, Frankreich, 2005, 96 ff.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Verfügbar unter: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fünfte überarbeitete Fassung. New York und Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Verfügbar unter:[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html)
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27–35.

## Anlage 1.1

## DEFINITIONEN

**Genauigkeit:** Grad der Übereinstimmung zwischen Prüfergebnissen und anerkannten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der „Relevanz“. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (21).

**AOP (Adverse Outcome Pathway):** Abfolge von Vorgängen, ausgehend von der chemischen Struktur einer Zielchemikalie oder Zielgruppe ähnlicher Chemikalien, über den molekularen auslösenden Vorgang bis hin zu einem In-vivo-Ergebnis von Interesse (22).

**Chemikalie:** Stoff oder Gemisch.

**CV75:** Die geschätzte Konzentration, die 75 % Zellviabilität zeigt.

**EC150:** die Konzentrationen, die die RFI-Werte von 150 in der CD86-Expression zeigen

**EC200:** die Konzentrationen, die die RFI-Werte von 200 in der CD54-Expression zeigen

**Durchflusszytometrie:** eine zytometrische Technik, bei der Zellen, die in einem Fluid suspendiert sind, einzeln durch eine Lichtstrahl fließen, das in für die Zellen und ihre Komponenten typischen Muster gestreut ist; Zellen werden häufig mit fluoreszierenden Markern gekennzeichnet, damit das Licht zuerst absorbiert und dann in geänderten Frequenzen ausgestrahlt wird.

**Gefahr:** Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder einer Situation, potenziell schädigende Auswirkungen zu haben, wenn ein Organismus, ein System oder eine (Teil-)Population diesem Stoff ausgesetzt ist.

**IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment):** Ein strukturierter Ansatz zur Gefahrenidentifizierung (Potenzial), Gefahrencharakterisierung (Potenz) und/oder Sicherheitsbeurteilung (Potenzial/Potenz und Exposition) einer Chemikalie oder Gruppe von Chemikalien, der strategisch sämtliche relevanten Daten für eine informierte regulatorische Entscheidung hinsichtlich potenziellen Gefahren und/oder Risiken und/oder des Bedürfnisses weiterer gezielter und somit minimaler Tests integriert und abwägt.

**Mediumkontrolle:** Ein unbehandeltes Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält. Diese Probe wird mit prüfchemikalienbehandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt, um festzustellen, ob das Lösungsmittel/Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

**Gemisch:** Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehreren Stoffen besteht.

**Einkomponentiger Stoff:** Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorhanden ist.

**Mehrkomponentiger Stoff:** Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens  $\geq 10\%$  w/w und  $< 80\%$  w/w vorhanden sind. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

**Positivkontrolle:** Ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

**Prähaptene:** Chemikalien, die erst nach einer abiotischen Umwandlung zu Sensibilisatoren werden

**Prohaptene:** Chemikalien, die ihr Hautsensibilisierungspotenzial erst durch eine enzymatische Bioaktivierung erlangen

**Relative Fluoreszenzintensität (RFI):** Relative Werte der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in chemisch behandelten Zellen im Vergleich zu MFI in mit Lösungsmittel/Vehikel behandelten Zellen.

**Relevanz:** Beschreibung der Beziehung zwischen dem Test und der untersuchten Wirkung und ob der Test aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Die Relevanz gibt an, inwieweit der Test die untersuchte biologische Wirkung richtig misst oder vorhersagt. Sie berücksichtigt auch die Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode (21).

**Zuverlässigkeit:** Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit und Intralabor-Wiederholbarkeit bewertet (21).

**Durchlauf:** Ein Durchlauf besteht aus einer oder mehreren hintereinander getesteten Prüfchemikalien mit einer Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle und mit einer Positivkontrolle.

**Sensitivität:** Der Anteil aller positiven/wirkungsvollen Chemikalien, die durch den Test korrekt eingestuft werden. Sie ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (21).

**Färbepuffer:** Eine mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit 0,1 % Rinderserumalbumin.

**Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle:** Eine unbehandelte Probe, die sämtliche Komponenten eines Prüfsystems enthält, außer der Prüfchemikalie, aber einschließlich des verwendeten Lösungsmittels/Vehikels. Sie wird verwendet, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst oder stabil verteilt wurden, zu bestimmen. Wenn mit einer simultanen Medienkontrolle geprüft wird, zeigt diese Probe außerdem, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

**Spezifität:** Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Dies ist ein Maß der Genauigkeit für eine Prüfmethode, die zu kategorischen Ergebnissen führt, und ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung der Relevanz einer Prüfmethode (21).

**Stoff:** Ein chemisches Element und seine Verbindungen im natürlichen Zustand oder durch ein Produktionsverfahren, die einen Zusatzstoff induzieren, der zur Erhaltung seiner Stabilität erforderlich ist, sowie Verunreinigungen, die aus dem verwendeten Prozess stammen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die getrennt sein können, ohne die Stabilität des Stoffes zu beeinträchtigen oder seine Zusammensetzung zu ändern.

**Prüfchemikalie:** Stoffe oder Gemische, die mit dieser Methode geprüft wurden.

**Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN-GHS):** Ein System, das die Einstufung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) gemäß normierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und Umweltgefahren vorschlägt und entsprechende Kommunikationselemente wie Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenberichte, Berichte zu Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitsdatenblätter anspricht, damit Informationen zu Nebenwirkungen mit Blick auf den Schutz von Menschen (einschließlich Mitarbeitern, Arbeitern, Logistikern, Verbrauchern und Ersthelfern) und der Umwelt zu übermitteln (23).

**UVCB:** Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

**Gültiger Test:** Ein Test, von dem angenommen wird, dass sie über ein ausreichendes Maß an Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck verfügt und die auf wissenschaftlich bewährten Prinzipien basieren. Ein Test ist niemals in einem absoluten Sinn gültig, sondern nur im Verhältnis zu einem definierten Zweck (21).

## Anlage 1.2

## LEISTUNGSTOFFE

Vor der routinemäßigen Anwendung des in dieser Anlage zur Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Labors ihre technische Leistungsfähigkeit demonstrieren, indem sie die erwartete h-CLAT-Vorhersage für die in Tabelle 1 empfohlenen 10 Leistungsstoffe korrekt ermitteln und die CV75-, EC150- und EC200-Werte, die in den betreffenden Referenzbereich fallen, bei mindestens 8 der 10 Leistungsstoffe bestimmen. Diese Leistungsstoffe wurden so ausgewählt, dass sie die Bandbreite von Reaktionen im Hinblick auf die Gefahr einer Hautsensibilisierung repräsentieren. Weitere Auswahlkriterien betrafen die Erhältlichkeit der Chemikalien im Handel, die Verfügbarkeit hochwertiger In-vivo-Referenzdaten und die Verfügbarkeit hochwertiger In-vitro-Daten aus der h-CLAT-Prüfmethode. Außerdem sind veröffentlichte Referenzdaten für die h-CLAT-Methode verfügbar (3) (14).

Tabelle 1

## Empfohlene Stoffe zum Nachweis der technischen Leistungsfähigkeit mit der h-CLAT-Methode

Leistungsstoffe	CAS-Nr.	Aggregatzustand	In-vivo-Vorhersage <sup>(1)</sup>	CV75 Referenzbereich in µg/ml <sup>(2)</sup>	h-CLAT-Ergebnisse für CD86 (EC150-Referenzbereich in µg/ml) <sup>(2)</sup>	h-CLAT-Ergebnisse für CD54 (EC200-Referenzbereich in µg/ml) <sup>(2)</sup>
2,4-Dinitrochlorbenzol	97-00-7	fest	Sensibilisator (extrem)	2–12	positiv (0,5–10)	positiv (0,5–15)
4-Phenylenediamin	106-50-3	fest	Allergen (stark)	5–95	positiv (< 40)	negativ (> 1,5) <sup>(3)</sup>
Nickelsulfat	10101-97-0	fest	Allergen (mäßig)	30–500	positiv (< 100)	positiv (10–100)
2-Mercaptbenzothiazol	149-30-4	fest	Allergen (mäßig)	30–400	negativ (> 10) <sup>(3)</sup>	positiv (10–140)
R(+)-Limonen	5989-27-5	flüssig	Allergen (schwach)	> 20	negativ (> 5) <sup>(3)</sup>	positiv (< 250)
Imidazolidinylharnstoff	39236-46-9	fest	Sensibilisator (schwach)	25–100	positiv (20–90)	positiv (20–75)
Isopropanol	67-63-0	flüssig	Nichsensibilisator	> 5 000	negativ (> 5 000)	negativ (> 5 000)
Glycerin	56-81-5	flüssig	Nichsensibilisator	> 5 000	negativ (> 5 000)	negativ (> 5 000)
Milchsäure	50-21-5	flüssig	Nichsensibilisator	1500–5000	negativ (> 5000)	negativ (> 5000)
4-Aminobenzoesäure	150-13-0	fest	Nichsensibilisator	> 1 000	negativ (> 1 000)	negativ (> 1000)

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service

<sup>(1)</sup> Die In-vivo-Gefahren- und (Potenz-)Vorhersagen basieren auf Daten des LLNA (3) (14). Die In-vivo-Potenz wird unter Anwendung der von ECETOC vorgeschlagenen Kriterien abgeleitet (24).

<sup>(2)</sup> Gestützt auf historische beobachtete Werte (13) (25).

<sup>(3)</sup> Historisch gesehen wurde eine Mehrzahl von negativen Ergebnissen für diesen Marker erhalten und deshalb ist ein negatives Ergebnis zu erwarten. Der vorgegebene Bereich wurde auf Basis der wenigen beobachteten historischen positiven Ergebnisse definiert. Falls ein positives Ergebnis ermittelt wird, sollte der EC-Wert innerhalb des eingetragenen Referenzbereichs liegen.

## Anlage 2

## IN-VITRO-HAUTSENSIBILISIERUNG: U937-AKTIVIERUNGSTEST MIT ZELLINIEN (U-SENS™)

## AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

1. Der U-SENS™-Test quantifiziert die Änderungen der Expression von Zelloberflächenmarkern in Zusammenhang mit dem Aktivierungsprozess von Monozyten und dendritischen Zellen (DC) (d. h. CD86) in der humanen histiozytären Lymphom-Zelllinie U937 nach einer Exposition gegenüber Allergenen (1). Die gemessenen Expressionswerte des Zelloberflächenmarkers CD86 in der Zelllinie U937 werden dann zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren verwendet.
2. Der U-SENS™-Test wurde in einer von L'Oréal koordinierten Validierungsstudie (2) und anschließend in einer unabhängigen Begutachtung durch den EURL ECVAM wissenschaftlichen beratenden Ausschuss (ESAC) (3) des Referenzlabors der europäischen Union für Alternativen zu Tierversuchen (EURL ECVAM) bewertet. Unter Berücksichtigung sämtlicher verfügbarer Nachweise und Informationen von Behörden und Interessenträgern wurde U-SENS™ von EURL ECVAM (4) empfohlen, um als Teil eines IATA verwendet zu werden, um die Unterscheidung zwischen Allergenen und Nichtsensibilisatoren zum Zweck der Gefahreinstufung und Etikettierung zu unterstützen. In ihrem Leitfaden zur Berichterstattung strukturierter Ansätze zur Datenintegration und individuellen Informationsquellen, die innerhalb von IATA für die Hautsensibilisierung verwendet werden, diskutiert die OECD derzeit eine Anzahl an Fallstudien, die verschiedene Teststrategien und Vorhersagemodelle beschreiben. Einer der anders definierten Ansätze basiert auf dem U-SENS-Test (5). Beispiele für die Verwendung der U-SENS™-Daten in Kombination mit anderen Informationen, einschließlich historischer Daten und vorhandener gültiger menschlicher Daten (6), werden auch an anderer Stelle in der Literatur aufgeführt (4) (5) (7).
3. Der U-SENS™-Test erwies sich als übertragbar auf Labore mit Erfahrung auf dem Gebiet der Zellkulturtechniken und der Durchflusszytometrieanalyse haben. Der Grad der Reproduzierbarkeit, der bei der Prüfmethode erwartet werden kann, liegt in der Größenordnung von 90 % und 84 % innerhalb und zwischen Labors (8). Die Ergebnisse der Validierungsstudie (8) und veröffentlichter Studien (1) weisen insgesamt darauf hin, dass die Genauigkeit bei der Unterscheidung von Hautsensibilisatoren (d. h. UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) gegenüber Nichtsensibilisatoren 86 % (N = 166) bei einer Empfindlichkeit von 91 % (118/129) und einer Spezifität von 65 % (24/37) im Vergleich zu den Ergebnissen des LLNA beträgt. Verglichen mit menschlichen Ergebnissen beträgt die Genauigkeit bei der Unterscheidung von Hautallergenen (d. h. UN-GHS/CLP Kat.1) von Nichtsensibilisatoren 77 % (N = 101) mit einer Sensitivität von 100 % (58/58) und einer Spezifität von 47 % (20/43). Im Vergleich zu LLNA ist bei falsch negativen Vorhersagen mit dem U-SENS™ die Chance größer, dass Chemikalien mit geringer bis mittlerer Hautsensibilisierungspotenz betroffen sind (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1B), als Chemikalien mit hoher Hautsensibilisierungspotenz (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1A) (1) (8) (9). Zusammenfassend geben diese Informationen an, wie nützlich sich der U-SENS™-Test bei der Beteiligung an der Identifikation von Hautsensibilisierungsgefahren erweist. Jedoch sind die Genauigkeitswerte, die hier für U-SENS™ als eigenständiger Test angegeben werden, lediglich als Anhaltspunkte zu betrachten, da die Prüfmethode in Kombination mit anderen Informationsquellen im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Bestimmungen unter Nummer 7 und 8 der allgemeinen Einleitung betrachtet werden sollte. Darüber hinaus sollte bei der Bewertung von Prüfmethoden zur Hautsensibilisierung ohne Tierversuche beachtet werden, dass der LLNA-Test sowie andere Tierversuche die Situation bei Menschen nicht vollständig widerspiegeln.
4. Auf der Basis der aktuell verfügbaren Daten wurde gezeigt, dass der U-SENS™-Test auf Prüfchemikalien angewandt werden kann (einschließlich Zutaten von Kosmetika, z. B. Konservierungsmittel, Tenside, Aktivstoffe, Farbstoffe), die eine Vielfalt an organischen Funktionsgruppen, physikalisch-chemischen Eigenschaften, Hautsensibilisierungspotenzial (wie in In-vivo-Studien festgelegt) und das Spektrum der Wirkmechanismen, das für seine Assoziation mit der Hautsensibilisierung bekannt ist, abdecken (d. h. Michael-Akzeptor, Schiff-Basisbildung, Acylübertragungsmittel, Substitution nukleophil bimolekular [SN2] oder nukleophile aromatische Substitution [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Der U-SENS™-Test gilt für Prüfchemikalien, die löslich sind oder eine stabile Dispersion (d. h. ein Kolloid oder eine Suspension, in denen die Prüfchemikalie sich nicht absetzt oder vom Lösungsmittel/Vehikel in verschiedene Phasen trennt) in einem geeigneten Lösungsmittel/Vehikel bilden (siehe Abschnitt 13). Im Datensatz eingetragene Chemikalien, die Prähaptene (d. h. durch Oxidierung aktivierte Stoffe) oder Prohaptene (d. h. Stoffe, die eine enzymatische Aktivierung erfordern, wie beispielsweise über P450-Enzyme) sind, wurden von U-SENS™ korrekt vorhergesagt (1) (10). Membranschädigende

Stoffe können aufgrund einer nichtspezifischen Erhöhung der CD86-Expression zu falsch positiven Ergebnissen führen, da 3 von 7 falsch positiven Ergebnissen in Bezug auf die In-vivo-Referenzeinstufung Tenside waren (1). Solche positiven Ergebnisse mit Tensiden sollen mit Vorsicht betrachtet werden, während negative Ergebnisse mit Tensiden weiterhin genutzt werden können, um die Identifizierung der Prüfchemikalie als Nichtsensibilisator zu unterstützen. Fluoreszierende Prüfchemikalien können mit U-SENS™ (1) bewertet werden. Dennoch beeinträchtigen stark fluoreszierende Prüfchemikalien, die mit derselben Wellenlänge ausstrahlen wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder Propidiumjodid (PI) die durchflusszytometrische Erkennung und können daher nicht mithilfe von mit FITC-konjugierten Antikörpern (potenziell falsch negativ) oder PI (Viabilität nicht messbar) bewertet werden. In einem solchen Fall können andere mit Fluorochrom markierte Antikörper bzw. andere Zytotoxizitätsmarker verwendet werden, solange aufgezeigt werden kann, dass sie ähnliche Ergebnisse liefern wie die mit FITC markierten Antikörper oder PI (siehe Abschnitt 18), z. B. durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2. Angesichts der vorstehenden Ausführungen sollten positive Ergebnisse mit Tensiden und negative Ergebnisse mit stark fluoreszierenden Prüfchemikalien im Kontext der angegebenen Grenzen und in Verbindung mit anderen Informationsquellen im Rahmen von IATA interpretiert werden. In Fällen, in denen die Nichtanwendbarkeit des U-SENS™-Tests bei anderen spezifischen Kategorien von Prüfchemikalien nachgewiesen wird, sollte sie bei diesen spezifischen Kategorien nicht verwendet werden.

5. Der U-SENS™-Test unterstützt, wie bereits oben erwähnt, die Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren. Er kann jedoch bei Verwendung im Rahmen von integrierten Ansätzen wie IATA möglicherweise auch zur Bewertung der Sensibilisierungspotenz beitragen. Es sind allerdings weitere Untersuchungen erforderlich, vorzugsweise auf der Grundlage von Humandaten, um herauszufinden, inwieweit die Ergebnisse von U-SENS™ möglicherweise zur Potenzbewertung herangezogen werden können.
6. Definitionen sind Anlage 2.1 zu entnehmen.

#### Prinzip Der Prüfmethode

7. Der U-SENS™-Test ist ein In-vitro-Test, der Änderungen der Expression von CD86-Zelloberflächenmarkern auf einer humanen histiozytären Lymphom-Zelllinie, U937-Zellen, nach einer Exposition von  $45 \pm 3$  Stunden gegenüber der Prüfchemikalie quantifiziert. Der Oberflächenmarker CD86 ist ein typischer Marker der U937-Aktivierung. CD86 ist dafür bekannt, ein ko-stimulierendes Molekül zu sein, das eine monozytische Aktivierung nachahmen kann, die eine wichtige Rolle beim T-Zellen-Priming spielt. Die Änderungen der Expression von Oberflächenmarkern von CD86 werden anhand der Durchflusszytometrien nach einer Zellfärbung, die typischerweise mit Antikörpern erfolgt, die mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert wurden, gemessen. Die Zytotoxizitätsmessung wird ebenfalls zur gleichen Zeit durchgeführt (z. B. durch die Verwendung von PI), um zu beurteilen, ob die Hochregulierung der Expression von CD86-Zelloberflächenmarkern bei Konzentrationen unterhalb des zytotoxischen Werts auftritt. Der Stimulationsindex (S.I.) des CD86-Zelloberflächenmarkers im Vergleich zur Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle wird berechnet und im Vorhersagemodell verwendet (siehe Abschnitt 19), um die Unterscheidung zwischen Allergenen und Nichtsensibilisatoren zu unterstützen.

#### Nachweis Der Kompetenz

8. Vor der routinemäßigen Verwendung des unter dieser Anlage zur Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Laboratorien ihre technische Kompetenz anhand der zehn in Anlage 2.2 aufgeführten Leistungsstoffe in Übereinstimmung mit bewährten In-vitro-Verfahren nachweisen (11). Darüber hinaus sollten Testbenutzer eine historische Datenbank der mit den Reaktivitätstests (siehe Abschnitt 11) und mit den positiven and Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen (siehe Abschnitte 15-16) erzeugten Daten pflegen und diese Daten nutzen, um zu bestätigen, dass die Reproduzierbarkeit des Tests in ihrem Labor mit der Zeit aufrechterhalten wird.

#### Verfahren

9. Dieser Test basiert auf dem U-SENS™ DataBase-Dienst zu Alternativmethoden für Tierversuche (DB-ALM) Protokoll Nr. 183 (12). Die Standardarbeitsanweisungen (SOP) sollten bei der Umsetzung und Verwendung des U-SENS™-Tests im Labor angewandt werden. Es kann ein automatisiertes System zur Durchführung von U-SENS™ verwendet werden, wenn aufgezeigt werden kann, dass es ähnliche Ergebnisse liefert, beispielsweise durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2. Nachfolgend werden die wichtigsten Komponenten und Verfahren für den U-SENS™-Test beschrieben.

### Vorbereitung der Zellen

10. Die humane histiozytäre Lymphom-Zelllinie U937 (13) sollte zur Durchführung des U-SENS™-Tests verwendet werden. Zellen (Klon CRL1593.2) sollten aus einer gut qualifizierten Zellbank wie der American Type Culture Collection entnommen werden.
11. U937-Zellen werden bei 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub> und einer befeuchteten Atmosphäre in einem mit 10 % fetales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin angereicherten RPMI-1 640-Medium (vollständiges Medium) kultiviert. U937-Zellen werden regelmäßig alle 2–3 Tage bei einer Dichte von 1,5 bzw. 3 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml passagiert. Die Zelldichte sollte 2 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml nicht überschreiten und die Zellviabilität, die anhand des Trypanblau-Ausschlusses gemessen wird, sollte ≥ 90 % betragen (nach dem Auftauen nicht an der ersten Passage anwenden). Vor ihrer Verwendung zu Testzwecken sollte jede Charge von Zellen, FCS oder Antikörpern qualifiziert werden, indem ein Reaktivitätstest durchgeführt wird. Der Reaktivitätstest der Zellen sollte mithilfe der Positivkontrolle, Picrylsulfonsäure (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure: TNBS) (CASRN 2 508-19-2, ≥ 99 % Reinheit) und der Negativkontrolle Milchsäure (LA) (CASRN 50-21-5, ≥ 85 % Reinheit) mindestens eine Woche nach dem Auftauen durchgeführt werden. Beim Reaktivitätstest sollten sechs endgültige Konzentrationen für jede der 2 Kontrollen geprüft werden (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml und LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). In vollständigem Medium gelöste TNBS sollte eine positive und von der Konzentration abhängige Wirkung auf CD86 zeigen (z. B. wenn auf eine positive Konzentration, CD86 S.I. ≥ 150, eine Konzentration mit steigendem CD86 S.I. folgt), und in vollständigem Medium gelöste LA sollte eine negative Wirkung auf CD86 zeigen (siehe Abschnitt 21). Nur die Chargen von Zellen, welche den Reaktivitätstest zwei Mal bestanden haben, dürfen für den Test verwendet werden. Zellen können bis zu sieben Wochen nach dem Auftauen gewonnen werden. Die Anzahl an Passagen sollte 21 nicht übersteigen. Der Reaktivitätstest sollte gemäß den in den Abschnitten 18–22 beschriebenen Verfahren durchgeführt werden.
12. Zur Prüfung werden die U937-Zellen bei einer Dichte von entweder 3 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml oder 6 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml ausgesät und in Kulturkolben 2 bzw. 1 Tag lang vorgezchtet. Andere vorgezchtete Bedingungen als diejenigen, die oben beschrieben werden, können verwendet werden, wenn eine ausreichende wissenschaftliche Begründung vorliegt und wenn gezeigt werden kann, dass ähnliche Ergebnisse geliefert werden, beispielsweise durch Testen der Leistungstoffe in Anlage 2.2. Am Testtag werden die Zellen, die aus dem Kulturkolben geerntet wurden, mit einem frischen Kulturmedium mit 5 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml neu angesetzt. Dann werden die Zellen in einer flachen Platte mit 96 Mulden mit 100 µl verteilt (endgültige Zelldichte von 0,5 × 10<sup>5</sup> Zellen/Mulde).

### Vorbereitung der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

13. Die Beurteilung der Löslichkeit wird vor dem Test vorgenommen. Zu diesem Zweck werden die Prüfchemikalien bei einer Konzentration von 50 mg/ml in vollständigem Medium als erste Lösungsmitteloption oder Dimethylsulfoxid (DMSO, ≥ 99 % Reinheit) als zweite Lösungsmittel-/Vehikeloption gelöst oder stabil verteilt, wenn die Prüfchemikalie nicht im Lösungsmittel/Vehikel des vollständigen Mediums löslich ist. Beim Test wird die Prüfchemikalie auf eine endgültige Konzentration von 0,4 mg/ml im vollständigen Medium gelöst, wenn die Chemikalie in diesem Lösungsmittel/Vehikel löslich ist. Wenn die Chemikalie nur in DMSO löslich ist, wird die Chemikalie bei einer Konzentration von 50 mg/ml gelöst. Andere als die oben beschriebenen Lösungsmittel/Vehikel können verwendet werden, wenn eine ausreichende wissenschaftliche Begründung gegeben ist. Die Stabilität der Prüfchemikalie im endgültigen Lösungsmittel/Vehikel sollte berücksichtigt werden.
14. Die Prüfchemikalien sowie die Kontrollstoffe werden am Tag des Tests vorbereitet. Da kein Test zur Dosisfindung durchgeführt wird, sollten für den ersten Durchlauf 6 endgültige Konzentrationen (1, 10, 20, 50, 100 und 200 µg/ml) im entsprechenden Lösungsmittel/Vehikel entweder in vollständigem Medium oder in 0,4 % DMSO im Medium geprüft werden. Bei den nachfolgenden Durchläufen sollten, ausgehend von den 0,4 mg/ml im vollständigen Medium oder 50 mg/ml in DMSO-Lösungen der Prüfchemikalie, mindestens 4 Arbeitslösungen mithilfe des entsprechenden Lösungsmittels/Vehikels vorbereitet werden (d. h. mindestens 4 Konzentrationen). Die Arbeitslösungen werden schließlich für die Behandlung verwendet, indem eine gleiche Menge der U937-Zellsuspension (siehe Abschnitt 11 oben) zum Volumen der Arbeitslösung in der Platte hinzugefügt wird, um eine weitere zweifache Verdünnung zu erhalten (12). Die Konzentrationen (mindestens 4 Konzentrationen) für weitere Durchläufe werden auf der Grundlage der individuellen Ergebnisse sämtlicher vorheriger Durchläufe gewählt (8). Die nutzbaren endgültigen Konzentrationen sind 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 und 200 µg/ml. Die höchste endgültige Konzentration beträgt 200 µg/ml. Wenn ein CD86 positiver Wert

bei 1 µg/ml beobachtet wird, dann werden 0,1 µg/ml bewertet, um die Konzentration der Prüfchemikalie zu finden, die CD86 nicht über dem positiven Schwellenwert induziert. Bei jedem Durchlauf wird der EC150 (Konzentration, bei der eine Chemikalie den positiven Schwellenwert für CD86 von 150 % erreicht, siehe Abschnitt 19) berechnet, falls eine positive Konzentrationswirkung für CD86 beobachtet wird. Wo die Prüfchemikalie eine positive CD86-Wirkung induziert, die nicht von der Konzentration abhängig ist, ist eine Berechnung von EC150 eventuell nicht relevant, wie dies im U-SENS™ DB-ALM Protokoll Nr. 183 (12) beschrieben wird. Bei jedem Durchlauf wird CV70 (Konzentration, bei der eine Chemikalie die Zytotoxizitätsschwelle von 70 % erreicht, siehe Abschnitt 19) wo immer möglich berechnet (12). Um den Konzentrationswirkungseffekt der CD86-Steigung zu untersuchen sollten Konzentrationen aus den verwendbaren Konzentrationen gleichmäßig zwischen EC150 (oder der höchsten CD86 negativen, nicht zytotoxischen Konzentration) und CV70 (oder der höchsten zulässigen Konzentration, d. h. 200 µg/ml) verteilt gewählt werden. Es sollten pro Durchlauf mindestens 4 Konzentrationen geprüft werden, wobei zu Vergleichszwecken mindestens 2 Konzentrationen mit den vorherigen Durchläufen übereinstimmen sollten.

15. Die im U-SENS™-Test verwendete Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle ist ein vollständiges Medium (für gelöste oder stabil im vollständigen Medium verteilte Prüfchemikalien) (siehe Abschnitt 4) oder 0,4 % DMSO in vollständigem Medium (für in DMSO gelöste oder stabil verteilte Prüfchemikalien).
16. Die im U-SENS™-Test verwendete Positivkontrolle ist TNBS (siehe Abschnitt 11), die in vollständigem Medium vorbereitet wird. TNBS sollte als Positivkontrolle für die CD86-Expressionsmessung mit einer endgültigen einzelnen Konzentration in der Platte (50 µg/ml) verwendet werden, die > 70 % der Zellviabilität erbringt. Um eine Konzentration von 50 µg/ml TNBS in der Platte zu erhalten, wird eine Stammlösung von 1M (d. h. 293 mg/ml) TNBS im vollständigen Medium vorbereitet und 2 930-fach mit dem vollständigen Medium in einer Arbeitslösung von 100 µg/ml verdünnt. Milchsäure (LA, CAS 50-21-5) sollte bei 200 µg/ml in vollständigem Medium gelöst als Negativkontrolle verwendet werden (von einer Stammlösung von 0,4 mg/ml). In jeder Platte jedes Durchlaufs werden drei Replikate der unbehandelten Kontrolle, Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle, Positiv- und Negativkontrollen im vollständigen Medium vorbereitet (12). Andere geeignete Positivkontrollen können verwendet werden, sofern historische Daten für die Ableitung vergleichbarer Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf zur Verfügung stehen. Die Akzeptanzkriterien des Durchlaufs entsprechen denen, die für die Prüfchemikalie beschrieben wurden (siehe Abschnitt 12).

### **Applikation der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe**

17. Die Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle oder die Arbeitslösungen, die in den Abschnitten 14–16 beschrieben werden, werden 1:1 (v/v) mit den in der flachen Platte mit 96 Mulden vorbereiteten Zellsuspensionen gemischt (siehe Abschnitt 12). Die behandelten Platten werden dann  $45 \pm 3$  Stunden bei 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Vor der Inkubation werden die Platten mit einer semipermeablen Membran versiegelt, um eine Verdampfung von flüchtigen Prüfchemikalien und eine Kreuzkontaminierung zwischen den mit den Prüfchemikalien behandelten Zellen zu vermeiden (12).

### **Zellfärbung**

18. Nach einer Expositionszeit von  $45 \pm 3$  Stunden werden die Zellen in eine V-förmige Mikrotiterplatte übertragen und durch Zentrifugierung gesammelt. Die Löslichkeitsinterferenz ist definiert als Kristalle oder Tropfen, die  $45 \pm 3$  Stunden nach der Behandlung (vor der Zellfärbung) unter dem Mikroskop beobachtet werden. Die Tenside werden entsorgt und die verbleibenden Zellen werden einmal mit 100 µl eiskalter mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit 5 % fetalem Kälberserum (Färbepuffer) gewaschen. Nach der Zentrifugierung werden die Zellen mit 100 µl Färbepuffer resuspendiert und mit 5 µl (z. B. 0,25 µg) mit FITC markierten anti-CD86- oder Maus-IgG1-Antikörpern (Isotyp) bei 4 °C 30 Minuten lang vor Licht geschützt. Die im U-SENS™ DB-ALM Protokoll Nr. 183 (12) beschriebenen Antikörper sollten verwendet werden (für CD86: BD-PharMingen #5556 57 Klon: Fun-1, oder Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Klon: BU63; und für IgG1: BD-PharMingen #5557 48, oder Caltag/Invitrogen # GM4992). Nach Erfahrung der Testentwickler ist die Fluoreszenzintensität der Antikörper normalerweise zwischen verschiedenen Chargen konsistent. Andere Klone oder Lieferanten der Antikörper, welche den Reaktivitätstest bestanden haben, können für den Test verwendet werden (siehe Abschnitt 11). Benutzer können jedoch erwägen, die Antikörper unter den Bedingungen im eigenen Labor zu titrieren, um die beste Gebrauchskonzentration zu definieren. Andere Erkennungssysteme, z. B. mit Fluorochrom markierte anti-CD86-Antikörper, können verwendet werden, wenn gezeigt

werden kann, dass sie ähnliche Ergebnisse wie mit FITC konjugierte Antikörper liefern, beispielsweise durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2. Die Zellen werden zweimal mit 100 µl Färbepuffer und einmal mit 100 µl einer eiskalten PBS gewaschen und anschließend in eiskalter PBS resuspendiert (z. B. 125 µl für Proben, die manuell Röhrchen für Röhrchen analysiert werden, oder 50 µl mithilfe einer Autosampler-Platte) und PI-Lösung wird hinzugefügt (endgültige Konzentration von 3 µg/ml). Andere Zytotoxizitätsmarker wie 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) oder Trypanblau können verwendet werden, wenn gezeigt werden kann, dass die alternativen Farbstoffe ähnliche Ergebnisse liefern wie PI, zum Beispiel durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2.

### Durchflusszytometrieanalyse

19. Die Expressionswerte von CD86 und die Zellviabilität werden mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Zellen werden in einem Größen- (FSC) und Granularitäts- (SSC) Dot-Plot angezeigt, der auf eine log-Skala eingestellt ist, um die Population eindeutig in einem ersten Gate R1 zu identifizieren und die Verschmutzung zu beseitigen. Für jede Mulde wird eine Sollgesamtmenge von 10 000 Zellen in Gate R1 aufgenommen. Zellen vom selben R1-Gate werden in einem FL3- oder FL4 / SSC-Dot-Plot angezeigt. Lebensfähige Zellen werden dargestellt, indem ein zweites Gate R2 platziert wird, das die Population von Propidiumjodid-negativen Zellen auswählt (FL3- oder FL4-Kanal). Die Zellviabilität kann anhand der folgenden Gleichung über das Zytometeranalyseprogramm berechnet werden. Wenn die Zellviabilität gering ist, könnten bis zu 20 000 Zellen einschließlich toter Zellen aufgenommen werden. Alternativ können die Daten eine Minute nach der Einleitung der Analyse aufgenommen werden.

$$\text{Zellviabilität} = \frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Gesamtzahl der aufgenommenen Zellen}} \times 100$$

Die Prozentzahl der FL1-positiven Zellen wird dann unter diesen lebensfähigen Zellen gemessen, die in R2 eingeschlossen sind (innerhalb von R1). Die Zelloberflächenexpression von CD86 wird in einem FL1- / SSC-Dot-Plot analysiert, das auf lebensfähigen Zellen eingeschlossen ist (R2).

Bei den vollständigen Medium/IgG1-Mulden befindet sich der Analysemarker in der Nähe der Hauptpopulation, sodass die Kontrollen des vollständigen Mediums einen IgG1 im Sollbereich von 0,6 bis 0,9 % aufweisen.

Die Farbinterferenz wird definiert als eine Verlagerung des mit FITC markierten IgG1-Dot-Plots (IgG1 FL1 geo. Mittelw. S.I.  $\geq 150$  %).

Der Stimulationsindex (S.I.) von CD86 für Kontrollzellen (unbehandelt oder in 0,4 % DMSO) und chemisch behandelte Zellen wird gemäß der folgenden Gleichung berechnet:

$$\text{S.I.} = \frac{\% \text{ von CD86}^+ \text{ behandelte Zellen} - \% \text{ von IgG1}^+ \text{ behandelte Zellen}}{\% \text{ von CD86}^+ \text{ Kontrollzellen} - \% \text{ von IgG1}^+ \text{ Kontrollzellen}} \times 100$$

% von IgG1<sup>+</sup> unbehandelte Kontrollzellen: bezeichnet als Prozentzahl der FL1-positiven IgG1-Zellen, die mit dem Analysemarker (zulässiger Bereich von  $\geq 0,6$  % und  $< 1,5$  %, siehe Abschnitt 22) unter den lebensfähigen unbehandelten Zellen definiert wurden.

% von IgG1<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup> Kontrolle/behandelte Zellen: bezeichnet als Prozentzahl von FL1-positiven IgG1/CD86-Zellen, die ohne Verlagerung des Analysemarkers unter den lebensfähigen Kontroll-/behandelten Zellen gemessen werden.

### DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

#### Datenauswertung

20. Die folgenden Parameter werden im U-SENS<sup>TM</sup>-Test berechnet: CV70-Wert, d. h. eine Konzentration, die 70 % des U937-Zellüberlebens (30 % Zytotoxizität) zeigt, und der EC150-Wert, d. h. die Konzentration, bei der die Prüfchemikalien einen CD86-Stimulationsindex (S.I.) von 150 % induzierten.

CV70 wird anhand der log-linearen Interpolation mithilfe der folgenden Gleichung berechnet:

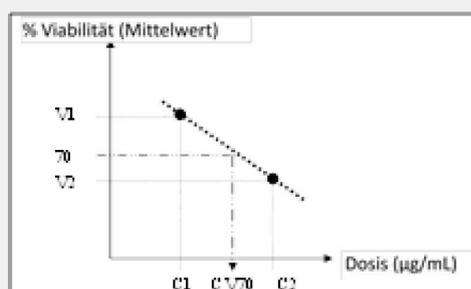
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

Dabei gilt:

V1 ist der Mindestwert der Zellviabilität über 70 %

V2 ist der Höchstwert der Zellviabilität unter 70 %

C1 und C2 sind die Konzentrationen, die den Wert der Zellviabilität V1 bzw. V2 zeigen.



Weitere Ansätze zur Ableitung von CV70 können angewandt werden, solange demonstriert wird, dass dies keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat (z. B. durch Testen der Leistungstoffe).

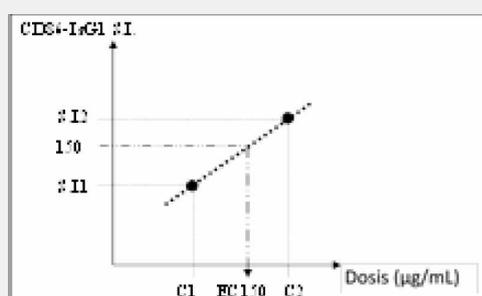
EC150 wird anhand der log-linearen Interpolation mithilfe der folgenden Gleichung berechnet:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

Dabei gilt:

C1 ist die höchste Konzentration in µg/ml mit einem CD86 S.I. < 150 % (S.I. 1)

C2 ist die niedrigste Konzentration in µg/ml mit einem CD86 S.I. ≥ 150 % (S.I. 2)

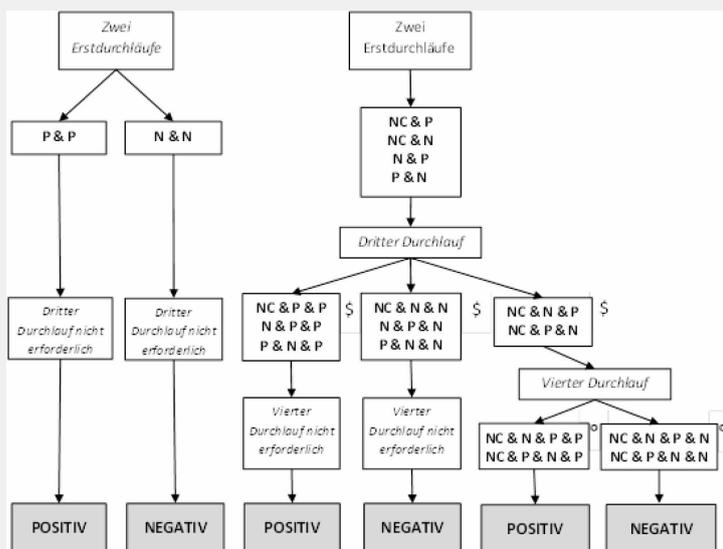


Die EC150- und CV70-Werte wurden für jeden

- Durchlauf berechnet: die individuellen EC150- und CV70-Werte wurden als Werkzeuge zur Untersuchung des Konzentrationswirkungseffekts der CD86-Steigung verwendet (siehe Abschnitt 14),
- gestützt auf die durchschnittlichen Lebensfähigkeiten wird der CV70-Gesamtwert bestimmt (12),
- gestützt auf die durchschnittlichen S.I. der CD86-Werte wird der EC150-Gesamtwert für die mit U-SENS™ als POSITIV vorhergesagte Prüfchemikalie bestimmt (siehe Abschnitt 21) (12).

**Vorhersagemodell**

21. Bei der CD86-Expressionsmessung wird jede Prüfchemikalie in mindestens vier Konzentrationen und in mindestens zwei unabhängigen Durchläufen geprüft (an unterschiedlichen Tagen durchgeführt), um eine einzelne Vorhersage abzuleiten (NEGATIV oder POSITIV).
  - Die individuelle Schlussfolgerung eines U-SENS™-Durchlaufs wird als Negativ (nachfolgend als „N“ bezeichnet) angesehen, wenn der S.I. von CD86 bei allen nicht-zytotoxischen Konzentrationen weniger als 150 % beträgt (Zellviabilität ≥ 70 %) und wenn keine Beeinträchtigung beobachtet wird (Zytotoxizität, Löslichkeit: siehe Abschnitt 18 oder Farbe: siehe Abschnitt 19 unabhängig der nicht-zytotoxischen Konzentrationen, bei denen die Beeinträchtigung erkannt wird). In allen anderen Fällen: S.I. von CD86 höher als oder gleich 150 % und/oder Beeinträchtigungen beobachtet, dann wird die individuelle Schlussfolgerung eines U-SENS™-Durchlaufs als Positiv (nachfolgend als „P“ bezeichnet) angesehen.
  - Eine U-SENS™-Vorhersage wird als NEGATIV angesehen, wenn mindestens zwei unabhängige Durchläufe negativ (N) sind (Abbildung 1). Wenn die ersten zwei Durchläufe beide negativ (N) sind, dann wird die U-SENS™-Vorhersage als NEGATIV angesehen und ein dritter Durchlauf ist nicht erforderlich.
  - Eine U-SENS™-Vorhersage wird als POSITIV angesehen, wenn mindestens zwei unabhängige Durchläufe positiv (P) sind (Abbildung 1). Wenn die ersten zwei Durchläufe beide positiv (P) sind, dann wird die U-SENS™-Vorhersage als POSITIV angesehen und ein dritter Durchlauf ist nicht erforderlich.
  - Da kein Test zur Dosisfindung durchgeführt wird, gibt es eine Ausnahme, wenn der S.I. von CD86 im ersten Durchlauf höher als oder gleich 150 % bei ausschließlich der höchsten, nicht-zytotoxischen Konzentration ist. Der Durchlauf wird dann als NICHT SCHLÜSSIG angesehen und zusätzliche Konzentrationen (zwischen der höchsten nicht-zytotoxischen Konzentration und der niedrigsten nicht-zytotoxischen Konzentration – siehe Abschnitt 20) sollten in zusätzlichen Durchläufen geprüft werden. Wenn ein Durchlauf als nicht schlüssig identifiziert wird, sollten mindestens 2 zusätzliche Durchläufe vorgenommen werden; ein vierter Durchlauf ist erforderlich, falls die Durchläufe 2 und 3 nicht konkordant sind (N und/oder P unabhängig voneinander) (Abbildung 1). Folgedurchläufe werden auch dann als positiv angesehen, wenn nur eine nicht-zytotoxische Konzentration ein CD86 von 150 % oder mehr ergibt, da die Konzentrationseinstellung für die spezifische Prüfchemikalie angepasst wurde. Die endgültige Vorhersage basiert auf dem Mehrheitsergebnis der drei oder vier individuellen Durchläufe (d. h. 2 von 3 oder 2 von 4) (Abbildung 1).



**Abb. 1:** Beim U-SENS™-Test verwendetes Vorhersagemodell. Eine U-SENS™-Vorhersage sollte im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Bestimmungen der Nummer 4 sowie der Nummern 7, 8 und 9 der allgemeinen Einleitung in Betracht gezogen werden

N: Durchlauf ohne Feststellung von CD86 als positiv oder mit Interferenz;

P: Durchlauf mit Feststellung von CD86 als positiv und/oder mit Interferenz(en);

NC: Nicht schlüssig. Erster Durchlauf als nicht schlüssig, wenn CD86 nur bei der höchsten nicht-zytotoxischen Konzentration positiv ist;

#: Eine nicht schlüssige individuelle Schlussfolgerung, die ausschließlich dem ersten Durchlauf zugeschrieben wird, führt automatisch zum Erfordernis eines dritten Durchlaufs, um eine Mehrheit von entweder Positiven (P) oder Negativen (N) Schlussfolgerungen in mindestens 2 von 3 unabhängigen Durchläufen zu erzielen.

§: Die Kästchen zeigen die relevanten Kombinationen der Ergebnisse aus den drei Durchläufen auf der Grundlage der Ergebnisse aus den ersten zwei Durchläufen, die im obigen Kästchen dargestellt sind.

°: Die Kästchen zeigen die relevanten Kombinationen der Ergebnisse aus den vier Durchläufen auf der Grundlage der Ergebnisse aus den ersten drei Durchläufen, die im obigen Kästchen dargestellt sind.

### Akzeptanzkriterien

22. Bei der Verwendung des U-SENS<sup>TM</sup>-Tests sollten die folgenden Akzeptanzkriterien erfüllt werden (12).

- Am Ende des Expositionszeitraums von  $45 \pm 3$  Stunden musste die Hauptviabilität der dreifach ausgefertigten unbehandelten U937-Zellen  $> 90 \%$  sein und es wurde keine Verschiebung der CD86-Expression beobachtet. Die basale CD86-Expression unbehandelter U937-Zellen musste im Bereich von  $\geq 2 \%$  und  $\leq 25 \%$  liegen.
- Wenn DMSO als ein Lösungsmittel verwendet wird, dann wird die Gültigkeit der DMSO-Vehikelkontrolle durch die Berechnung eines DMSO S.I. im Vergleich zu unbehandelten Zellen bewertet und die Viabilität der dreifach ausgeführten Zellen musste  $> 90 \%$  liegen. Die DMSO-Vehikelkontrolle ist gültig, wenn der Mittelwert des dreifach ausgeführten CD86 S.I. kleiner als  $250 \%$  des Mittelwerts des dreifach ausgeführten CD86 S.I. von unbehandelten U937-Zellen war.
- Die Durchläufe werden als gültig angesehen, wenn mindestens zwei von drei IgG1-Werte von unbehandelten U937-Zellen in den Bereich von  $\geq 0,6 \%$  und  $< 1,5 \%$  gefallen sind.
- Die gleichzeitig geprüfte Negativkontrolle (Milchsäure) wird als gültig angesehen, wenn mindestens zwei der drei Replikate negativ (CD86 S.I.  $< 150 \%$ ) und nicht-zytotoxisch waren (Zellviabilität  $\geq 70 \%$ ).
- Die Positivkontrolle (TNBS) wurde als gültig angesehen, wenn mindestens zwei der drei Replikate positiv (CD86 S.I.  $\geq 150 \%$ ) und nicht-zytotoxisch waren (Zellviabilität  $\geq 70 \%$ ).

### Prüfbericht

23. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten.

#### *Prüfchemikalie*

Einkomponentiger Stoff:

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;

- physikalisches Erscheinungsbild, Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in DMSO, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, im verfügbaren Umfang;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoff und Gemisch:

- Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Komponenten, soweit verfügbar;
- physikalisches Erscheinungsbild, Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in DMSO und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, im verfügbaren Umfang;
- Molekulargewicht oder scheinbares Molekulargewicht im Fall von Gemischen/Polymeren mit bekannter Zusammensetzung oder andere für die Durchführung der Studie relevante Informationen;
- Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

*Kontrollen*

Positivkontrolle

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
- physikalisches Erscheinungsbild, Löslichkeit in DMSO, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern verfügbar und falls zutreffend;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

- ggf. Verweis auf historische Ergebnisse von Positivkontrollen, die geeignete Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf dokumentieren.

#### Negativ- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle:

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Aussehen, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern andere Kontroll-Lösungsmittel/Vehikel als die in der Prüfrichtlinie genannten verwendet werden und soweit verfügbar;
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

#### Prüfbedingungen

- Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;
- Beschreibung des verwendeten Prüfprotokolls;
- verwendete Zelllinie, zugehörige Lagerbedingungen und Quelle (z. B. Einrichtung, von der sie gewonnen wurden);
- die verwendete Durchflusszytometrie (z. B. Modell), einschließlich der Geräteeinstellungen, Antikörper und verwendeten Zytotoxizitätsmarker;
- das angewandte Verfahren zum Nachweis der Kompetenz des Labors bei der Durchführung des Tests durch Prüfen der Leistungsstoffe) und das angewandte Verfahren zum Nachweis der reproduzierbaren Leistung des Tests im Zeitverlauf, z. B. historische Kontrolldaten und/oder Daten zu historischen Reaktivitätstests.

#### Validitätskriterien

- Zellviabilität und CD86 S.I.-Werte aus der Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle im Vergleich zu den Validitätsbereichen;
- Zellviabilität und S.I.-Werte aus der Positivkontrolle im Vergleich zu den Validitätsbereichen;
- Zellviabilität aller geprüften Konzentrationen der geprüften Chemikalie.

#### Prüfverfahren

- Anzahl der vorgenommenen Durchläufe;
- Konzentrationen der Prüfchemikalie, Applikationen und angewandte Expositionsdauer (falls von den Empfehlungen abweichend)
- Expositionsdauer;

- Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren.

#### *Ergebnisse*

- Tabellierung der Daten, einschließlich CV70 (falls anwendbar), S.I., Zellviabilitätswerte, EC150-Werte (falls anwendbar) für die Prüfchemikalie und für die Positivkontrolle in jedem Durchlauf und eine Anzeige der Einstufung der Prüfchemikalie gemäß dem Vorhersagemodell;
- Beschreibung etwaiger sonstiger relevanter Beobachtungen, falls zutreffend.

#### *Erörterung der Ergebnisse*

- Erörterung der anhand des U-SENS<sup>TM</sup>-Tests erhaltenen Ergebnisse;
- Analyse der Prüfergebnisse im Rahmen eines IATA, sofern sonstige relevante Informationen vorliegen.

#### *Schlussfolgerungen*

### **LITERATURHINWEISE**

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS<sup>TM</sup> test method Validation Study Report. Verfügbar unter:[http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations)
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS<sup>TM</sup> test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Verfügbar unter: [ <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>].
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Verfügbar unter:<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].

- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337–351.
- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373–382.
- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259–270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683–1 696.
- (11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter:[http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf).
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS<sup>TM</sup>), 33ff. Verfügbar unter: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565–577.
- (14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter:<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) Vereinte Nationen (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sechste überarbeitete Fassung, New York und Genf: United Nations Publications. Verfügbar unter:[http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf).
- (16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter:<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Verfügbar unter:[https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC\\_2003-TR87.pdf](https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf).

## Anlage 2.1

## DEFINITIONEN

**Genauigkeit:** Grad der Übereinstimmung zwischen Prüfergebnissen und anerkannten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der „Relevanz“. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse eines Tests (14).

**AOP (Adverse Outcome Pathway):** Abfolge von Vorgängen, ausgehend von der chemischen Struktur einer Zielchemikalie oder Zielgruppe ähnlicher Chemikalien, über den molekularen auslösenden Vorgang bis hin zu einem In-vivo-Ergebnis von Interesse (15).

**CD86-Konzentrationswirkung:** Es liegt eine Konzentrationsabhängigkeit (oder Konzentrationswirkung) vor, wenn auf eine positive Konzentration (CD86 S.I.  $\geq 150$ ) eine Konzentration mit einem steigenden CD86 S.I. folgt.

**Chemikalie:** Stoff oder Gemisch.

**CV70:** Die geschätzte Konzentration, die 70 % Zellviabilität zeigt.

**Verschiebung:** Eine Verschiebung wird definiert durch i) den korrigierten %CD86<sup>+</sup>-Wert des unbehandelten Kontrollreplikats 3 beträgt weniger als 50 % des Mittelwerts des korrigierten %CD86<sup>+</sup> Werts der unbehandelten Kontrollreplikate 1 und 2; und ii) der korrigierte %CD86<sup>+</sup>-Wert des Negativkontrollreplikats 3 beträgt weniger als 50 % des Mittelwerts des korrigierten %CD86<sup>+</sup> Werts der Negativkontrollreplikate 1 und 2.

**EC150:** die geschätzten Konzentrationen, die 150 % S.I. der CD86-Expression aufzeigen.

**Durchflusszytometrie:** eine zytometrische Technik, bei der Zellen, die in einem Fluid suspendiert sind, einzeln durch eine Lichtstrahl fließen, das in für die Zellen und ihre Komponenten typischen Muster gestreut ist; Zellen werden häufig mit fluoreszierenden Markern gekennzeichnet, damit das Licht zuerst absorbiert und dann in geänderten Frequenzen ausgestrahlt wird.

**Gefahr:** Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder einer Situation, potenziell schädigende Auswirkungen zu haben, wenn ein Organismus, ein System oder eine (Teil-)Population diesem Stoff ausgesetzt ist.

**IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment):** Ein strukturierter Ansatz zur Gefahrenidentifizierung (Potenzial), Gefahrencharakterisierung (Potenz) und/oder Sicherheitsbeurteilung (Potenzial/Potenz und Exposition) einer Chemikalie oder Gruppe von Chemikalien, der strategisch sämtliche relevanten Daten für eine informierte regulatorische Entscheidung hinsichtlich potenziellen Gefahren und/oder Risiken und/oder des Bedürfnisses weiterer gezielter und somit minimaler Tests integriert und abwägt.

**Gemisch:** Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehreren Stoffen besteht.

**Einkomponentiger Stoff:** Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorhanden ist.

**Mehrkomponentiger Stoff:** Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens  $\geq 10\%$  w/w und  $< 80\%$  w/w vorhanden sind. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

**Positivkontrolle:** Ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

**Prähaptene:** Chemikalien, die durch abiotische Transformation zu Allergenen werden, z. B. durch Oxidierung.

**Prohaptene:** Chemikalien, die eine enzymatische Aktivierung erfordern, um ihr Hautsensibilisierungspotenzial auszuschöpfen.

**Relevanz:** Beschreibung der Beziehung zwischen dem Test und der untersuchten Wirkung und ob der Test aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Die Relevanz gibt an, inwieweit der Test die untersuchte biologische Wirkung richtig misst oder vorhersagt. Die Relevanz umfasst die Einbeziehung der Genauigkeit (Übereinstimmung) eines Tests (14).

**Zuverlässigkeit:** Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Labors über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit und Intralabor-Wiederholbarkeit bewertet (14).

**Durchlauf:** Ein Durchlauf besteht aus einer oder mehreren hintereinander getesteten Prüfchemikalien mit einer Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle und mit einer Positivkontrolle.

**Sensitivität:** Der Anteil aller positiven/wirkungsvollen Chemikalien, die durch den Test korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (14).

**S.I.:** Stimulationsindex. Relative Werte der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität in chemisch behandelten Zellen im Vergleich zu mit Lösungsmittel behandelten Zellen.

**Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle:** Eine unbehandelte Probe, die sämtliche Komponenten eines Prüfsystems enthält, außer der Prüfchemikalie, aber einschließlich des verwendeten Lösungsmittels/Vehikels. Sie wird verwendet, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst oder stabil verteilt wurden, zu bestimmen. Wenn mit einer simultanen Medienkontrolle geprüft wird, zeigt diese Probe außerdem, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

**Spezifität:** Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (14).

**Färbepuffer:** Eine mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit 5 % fetalem Kälberserum.

**Stoff:** Ein chemisches Element und seine Verbindungen im natürlichen Zustand oder durch ein Produktionsverfahren, die einen Zusatzstoff induzieren, der zur Erhaltung seiner Stabilität erforderlich ist, sowie Verunreinigungen, die aus dem verwendeten Prozess stammen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die getrennt sein können, ohne die Stabilität des Stoffes zu beeinträchtigen oder seine Zusammensetzung zu ändern.

**Prüfchemikalie:** Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

**Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN-GHS):** Ein System, das die Einstufung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) gemäß normierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und Umweltgefahren vorschlägt und entsprechende Kommunikationselemente wie Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenberichte, Berichte zu Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitsdatenblätter anspricht, damit Informationen zu Nebenwirkungen mit Blick auf den Schutz von Menschen (einschließlich Mitarbeitern, Arbeitern, Logistikern, Verbrauchern und Ersthelfern) und der Umwelt zu übermitteln (16).

**UVCB:** Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

**Gültiger Test:** Ein Test, von dem angenommen wird, dass sie über ein ausreichendes Maß an Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck verfügt und die auf wissenschaftlich bewährten Prinzipien basieren. Ein Test ist niemals in einem absoluten Sinn gültig, sondern im Verhältnis zu einem definierten Zweck (14).

## Anlage 2.2

## LEISTUNGSTOFFE

Vor der routinemäßigen Anwendung des in dieser Anlage zu Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Labors ihre technische Leistungsfähigkeit demonstrieren, indem sie die erwartete U-SENS™-Vorhersage für die in Tabelle 1 empfohlenen 10 Stoffe korrekt ermitteln und die CV70- und EC150-Werte, die in den betreffenden Referenzbereich fallen, bei mindestens 8 der 10 Leistungsstoffe bestimmen. Diese Leistungsstoffe wurden so ausgewählt, dass sie die Bandbreite von Reaktionen im Hinblick auf die Gefahr einer Hautsensibilisierung repräsentieren. Weitere Auswahlkriterien betrafen die Erhältlichkeit der Stoffe im Handel, und dass qualitativ hochwertige In-vivo-Referenzdaten sowie qualitativ hochwertige In-vitro-Daten aus dem U-SENS™-Test verfügbar sind. Außerdem sind veröffentlichte Referenzdaten für den U-SENS™-Test verfügbar (1) (8).

Tabelle 1

**Empfohlene Stoffe zum Nachweis der technischen Leistungsfähigkeit beim U-SENS™-Test**

Leistungsstoffe	CAS-Nr.	Aggregatzustand	In-vivo-Vorhersage <sup>(1)</sup>	U-SENS Lösungsmittel/Vehikel	U-SENS CV70 Referenz Bereich in µg/ml <sup>(2)</sup>	U-SENS EC150 Referenz Bereich in µg/ml <sup>(2)</sup>
4-Phenylenediamin	106-50-3	fest	Allergen (stark)	Vollständiges Medium <sup>(3)</sup>	< 30	positiv (≤ 10)
Picrylschwefelsäure	2508-19-2	flüssig	Allergen (stark)	Vollständiges Medium	> 50	positiv (≤ 50)
Diethylmaleat	141-05-9	flüssig	Allergen (mäßig)	DMSO	10–100	positiv (≤ 20)
Resorcin	108-46-3	fest	Allergen (mäßig)	Vollständiges Medium	> 100	positiv (≤ 50)
Zimtalkohol	104-54-1	fest	Allergen (schwach)	DMSO	> 100	positiv (10–100)
4-Allylanisol	140-67-0	flüssig	Sensibilisator (schwach)	DMSO	> 100	positiv (< 200)
Saccharin	81-07-2	fest	Nichtsensibilisator	DMSO	> 200	negativ (> 200)
Glycerin	56-81-5	flüssig	Nichtsensibilisator	Vollständiges Medium	> 200	negativ (> 200)
Milchsäure	50-21-5	flüssig	Nichtsensibilisator	Vollständiges Medium	> 200	negativ (> 200)
Salicylsäure	69-72-7	fest	Nichtsensibilisator	DMSO	> 200	negativ (> 200)

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service

<sup>(1)</sup> Die Vorhersagen der In-vivo-Gefahr (und Potenz) basieren auf LLNA-Daten (1) (8). Die In-vivo-Potenz wird unter Anwendung der von ECETOC vorgeschlagenen Kriterien abgeleitet (17).

<sup>(2)</sup> Basierend auf den historischen beobachteten Werten (1) (8).

<sup>(3)</sup> Vollständiges Medium RPMI-1640-Medium, ergänzt durch 10 % fetales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (8).

## Anlage 3

## IN-VITRO-HAUTSENSIBILISIERUNG: IL-8 LUC-TEST

## AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

1. Im Gegensatz zu Tests, die die Expression von Zelloberflächenmarkern analysieren, quantifiziert der IL-8-Luc-Test die Änderungen des IL-8-Expressions, ein Zytokin im Zusammenhang mit der Aktivierung dendritischer Zellen (DC). In der von THP-1 abgeleiteten IL-8-Reporter-Zelllinie (THP-G8, etabliert aus der humanen akuten monozytischen Leukämiezelllinie THP-1) wird die IL-8-Expression nach der Exposition gegenüber Allergenen gemessen (1). Die Expression der Luciferase wird dann verwendet, um bei der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren zu helfen.
2. Der IL-8-Luc-Test wurde in einer Validierungsstudie (2), das vom Japanischen Zentrum für die Validierung von Alternativmethoden (JaCVAM), dem **Ministerium für Wirtschaft, Handel und Industrie** (METI) und der Japanischen Gesellschaft **für Alternativen zu Tierversuchen** (JSAAE) durchgeführt wurde, bewertet und anschließend einer unabhängigen Begutachtung (3) unter der Aufsicht des JaCVAM und des Ministeriums für Gesundheit, Arbeit und Wohlstand (MHLW) mit Unterstützung der **Internationalen Kooperation für alternative** Prüfmethode (ICATM) unterzogen. Unter Berücksichtigung sämtlicher verfügbarer Nachweise und Informationen von Behörden und Interessenträgern wurde der IL-8-Luc-Test als Teil eines IATA als nützlich angesehen, zwischen Allergenen und Nichtsensibilisatoren zum Zweck der Gefahreinstufung und Etikettierung zu unterscheiden. Beispiele für die Verwendung von IL-8-Luc-Test-Daten in Kombination mit anderen Informationen werden in der Literatur beschrieben (4) (5) (6).
3. Der IL-8-Luc-Test stellte sich als übertragbar auf Labore heraus, die mit Zellkulturen und Luciferasemessungen Erfahrung haben. Laborreproduzierbarkeiten lagen zwischen 87,7 % bzw. 87,5 % (2). Daten, die in der Validierungsstudie (2) und anderen veröffentlichten Arbeiten (1) (6) erzeugt wurden, zeigen, dass der IL-8-Luc-Test im Vergleich zu LLNA 118 von 143 Chemikalien als positiv oder negativ und 25 Chemikalien als nicht schlüssig eingestuft hat und die Genauigkeit des IL-8-Luc-Tests bei der Unterscheidung von Hautallergenen (UN-GHS/CLP Kat. 1) von Nichtsensibilisatoren (UN-GHS/CLP Nr. Kat.) beträgt 86 % (101/118) mit einer Sensitivität von 96 % (92/96) und einer Spezifität von 41 % (9/22). Außer den unten beschriebenen Stoffen außerhalb des Anwendungsbereichs (Abschnitt 5) stuft der IL-8-Luc-Test 113 von 136 Chemikalien als positiv oder negativ und 23 Chemikalien als nicht schlüssig ein und die Genauigkeit des IL-8-Luc-Tests liegt bei 89 % (101/113) mit einer Sensitivität von 96 % (92/96) und einer Spezifität von 53 % (9/17). Unter Anwendung der in Urbisch et al. zitierten Humandaten (7) stuft der IL-8-Luc-Test 76 von 90 Chemikalien als positiv oder negativ und 14 Chemikalien als nicht schlüssig ein und die Genauigkeit liegt bei 80 % (61/76), die Sensitivität bei 93 % (54/58) und die Spezifität bei 39 % (7/18). Außer den Stoffen außerhalb des Anwendungsbereichs stuft der IL-8-Luc-Test 71 von 84 Chemikalien als positiv oder negativ und 13 Chemikalien als nicht schlüssig ein und die Genauigkeit liegt bei 86 % (61/71) mit einer Sensitivität von 93 % (54/58) und einer Spezifität von 54 % (7/13). Falsch negative Vorhersagen mit dem IL-8-Luc-Test treten wahrscheinlicher bei Chemikalien auf, die eine niedrige/mittlere Hautsensibilisierungspotenz (UN-GHS/CLP Unterkategorie 1B) aufweisen als bei denjenigen mit einer hohen Potenz (UN-GHS/CLP Unterkategorie 1A) (6). Zusammen unterstützen die Informationen die Zweckdienlichkeit des IL-8-Luc-Tests bei der Identifizierung von Hautsensibilisierungsgefahren. Jedoch sollte die Genauigkeit, die hier für den IL-8-Luc-Test als eigenständiger Test angegeben wird, in Kombination mit anderen Informationsquellen im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Bestimmungen unter Nummer 7 und 8 oben in der Allgemeinen Einleitung betrachtet werden. Darüber hinaus sollte bei der Bewertung von Tests zur Hautsensibilisierung ohne Tierversuche beachtet werden, dass der LLNA sowie andere Tierversuche die Situation bei Menschen nicht vollständig widerspiegeln.
4. Auf der Grundlage der gegenwärtig verfügbaren Daten über den IL-8-Luc-Test wurde nachgewiesen, dass er bei Prüfchemikalien, die eine Vielzahl an organischen Funktionsgruppen, Reaktionsmechanismen, Hautsensibilisierungspotenzial (wie in In-vivo-Studien festgestellt) und physikalisch-chemischen Eigenschaften abdecken, anwendbar ist (2) (6).

5. Obwohl der IL-8-Luc-Test X-VIVO™ 15 als Lösungsmittel verwendet, bewertete es Chemikalien mit einem  $\log K_{ow} > 3,5$  und diejenigen mit einer Wasserlöslichkeit von ungefähr 100 µg/ml wie von der EPI Suite™ berechnet korrekt und seine Leistung bei der Erkennung von Allergenen mit schlechter Wasserlöslichkeit ist besser als die des IL-8-Luc-Tests, das Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel verwendet (2). Negative Ergebnisse für Prüfchemikalien, die nicht bei 20 mg/ml gelöst werden, können falsch negative Ergebnisse hervorrufen, da sie nicht in X-VIVO™ 15 löslich sind. Deshalb sollten negative Ergebnisse für diese Chemikalien nicht berücksichtigt werden. Bei der Validierungsstudie gab es eine hohe Falsch-Negativ-Rate für Anhydride. Darüber hinaus können Prohaptene (Stoffe, die eine Stoffwechselaktivierung erfordern) und Prähaptene (Stoffe, die durch Oxidation aktiviert werden) aufgrund der eingeschränkten Stoffwechselfähigkeit der Zelllinie (8) und der Versuchsbedingungen falsch negative Ergebnisse hervorrufen. Obwohl negative Ergebnisse für mutmaßliche Prä-/Prohaptene jedoch mit Vorsicht interpretiert werden sollten, hat der IL-8-Luc-Test 11 von 11 Prähaptene, 6/6 Prohaptene und 6/8 Prä-/Prohaptene im IL-8-Luc-Test-Datensatz korrekt eingestuft (2). Auf der Grundlage der kürzlichen umfassenden Begutachtung von drei Tests ohne Tierversuche (DPRA, KeratinoSens™ und h-CLAT) zur Erkennung von Prä- und Prohaptenen (9) und basierend auf der Tatsache, dass THP-G8-Zellen im IL-8-Luc-Test verwendet werden, wird eine Zelllinie von THP-1 abgeleitet, die in h-CLAT verwendet wird; der IL-8-Luc-Test kann auch dazu beitragen, die Sensitivität von Tests ohne Tierversuche zur Erkennung von Prä- und Prohaptenen in der Kombination anderer Tests zu steigern. Bisher geprüfte Tenside führten unabhängig von ihrem Typ (z. B. kationisch, anionisch oder nichtionisch) zu (falsch) positiven Ergebnissen. Schließlich können Chemikalien, die mit Luciferase interferieren, die Aktivität/Messung durcheinander bringen, was zu einer offensichtlichen Hemmung oder einer erhöhten Lumineszenz führt (10). Beispielweise wurde eingetragen, dass Phytoöstrogenkonzentrationen  $> 1 \mu\text{M}$  die Lumineszenzsignale in anderen auf Luciferase basierenden Reporter-Gen-Tests aufgrund der Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens stören. Infolgedessen muss die Luciferase-Expression, die bei hohen Konzentrationen von Phytoöstrogenen oder Verbindungen, die vermutlich eine mit Phytoöstrogen vergleichbare Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens bewirken, sorgfältig untersucht werden (11). Basierend auf den obigen Aussagen liegen Tenside, Anhydride und Chemikalien, die Luciferase beeinträchtigen, außerhalb des Anwendungsbereichs dieser Tests. In Fällen, in denen die Nichtanwendbarkeit des IL-8-Luc-Tests bei anderen spezifischen Kategorien von Prüfchemikalien nachgewiesen wird, sollte der Test bei diesen spezifischen Kategorien nicht verwendet werden.
6. Der IL-8-Luc-Test unterstützt, wie bereits oben erwähnt, die Unterscheidung von Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren. Weitere Arbeiten, vorzugsweise basierend auf menschlichen Daten, sind erforderlich, um zu bestimmen, ob die Ergebnisse von IL-8-Luc zur Potenzbewertung beitragen können, wenn sie in Kombination mit anderen Informationsquellen berücksichtigt werden.
7. Definitionen sind Anlage 3.1 zu entnehmen.

#### PRINZIP DER PRÜFMETHODE

8. Der IL-8-Luc-Test nutzt eine humane monozytische Leukämie-Zelllinie THP-1, die von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) erhalten wurde. Mit dieser Zelllinie etablierte die Abteilung für Dermatologie der Tohoku University School of Medicine eine von THP-1 abgeleitete IL-8-Reporter-Zelllinie, THP-G8, die die Luciferase-Gene „Stable Luciferase Orange (SLO)“ und „Stable Luciferase Red (SLR)“ unter der Kontrolle von IL-8 bzw. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Trägern beherbergt (1). Dies ermöglicht die quantitative Messung der Luciferase-Geninduktion durch Lumineszenzerkennung unter Verwendung von bekannten lichterzeugenden Luciferase-Substraten als Indikator für die Aktivität des IL-8 und GAPDH in Zellen nach Exposition gegenüber sensibilisierenden Chemikalien.
9. Das zweifarbige Prüfsystem besteht aus einer orange emittierenden Luciferase (SLO;  $\lambda_{max} = 580 \text{ nm}$ ) (12) für die Genexpression des IL-8-Trägers sowie einer rot emittierenden Luciferase (SLR;  $\lambda_{max} = 630 \text{ nm}$ ) (13) für die Genexpression des internen Kontrollträgers GAPDH. Die zwei Luciferasen strahlen bei der Reaktion mit Leuchtkäfer-d-Luciferin verschiedene Farben aus und ihre Lumineszenz wird gleichzeitig in einer einstufigen Reaktion gemessen, indem die Emission von der Testmischung mithilfe eines optischen Filters geteilt wird (14) (Anlage 3.2).

10. THP-G8-Zellen werden 16 Stunden lang mit der Prüfchemikalie behandelt und danach wird die SLO-Luciferase-Aktivität (SLO-LA) gemessen, die die IL-8-Trägeraktivität widerspiegelt, sowie die SLR-Luciferase-Aktivität (SLR-LA), die die GAPDH-Trägeraktivität widerspiegelt. Um die Abkürzungen leicht verständlich zu machen, wenden SLO-LA und SLR-LA als IL8LA bzw. GAPLA bezeichnet. Tabelle 1 bietet eine Beschreibung der Ausdrücke im Zusammenhang mit der Luciferase-Aktivität im IL-8-Luc-Test. Die gemessenen Werte werden verwendet, um das normalisierte IL8LA (nIL8LA) zu berechnen, das das Verhältnis von IL8LA zu GAPLA ist; die Induktion von nIL8LA (Ind-IL8LA), das das Verhältnis des arithmetischen Mittels der in vierfacher Ausfertigung gemessenen Wert des nIL8LA von mit einer Prüfchemikalie behandelten THP-G8-Zellen zu den Werten des nIL8LA der unbehandelten THP-G8-Zellen ist; und die Hemmung von GAPLA (Inh-GAPLA), das das Verhältnis des arithmetischen Mittels der in vierfacher Ausfertigung gemessenen Werte des GAPLA von mit einer Prüfchemikalie behandelten THP-G8-Zellen zu den Werten des GAPLA der unbehandelten THP-G8-Zellen ist und als Indikator für die Zytotoxizität verwendet wird.

Tabelle 1

**Beschreibung der Ausdrücke im Zusammenhang mit der Luciferase-Aktivität im IL-8-Luc-Test**

Abkürzungen	Definition
GAPLA	SLR-Luciferase-Aktivität, die die GAPDH-Trägeraktivität widerspiegelt
IL8LA	SLO-Luciferase-Aktivität, die die IL-8-Trägeraktivität widerspiegelt
nIL8LA	$IL8LA / GAPLA$
Ind-IL8LA	nIL8LA von mit Chemikalien behandelten THP-G8-Zellen / nIL8LA von unbehandelten Zellen
Inh-GAPLA	GAPLA von mit Chemikalien behandeltem THP-G8 / GAPLA von unbehandelten Zellen
CV05	Die niedrigste Konzentration der Chemikalie, bei der $Inh-GAPLA < 0,05$ wird.

11. Es stehen Leistungsnormen (15) zur Verfügung, die die Validierung geänderter In-vitro-IL-8-Luciferase-Tests ähnlich dem IL-8-Luc-Test sowie die rechtzeitige Anpassung der OECD-Prüfrichtlinie 442E für deren Einbeziehung ermöglichen. Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß OECD wird nur für Tests garantiert, die gemäß diesen Leistungsnormen validiert wurden, sofern diese Tests von der OECD überprüft und in die Prüfrichtlinie 442E aufgenommen wurden (16).

**NACHWEIS DER KOMPETENZ**

12. Vor der routinemäßigen Verwendung des unter dieser Anlage zur Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Laboratorien ihre technische Kompetenz anhand der zehn in Anlage 3.3 aufgeführten Leistungsstoffe in Übereinstimmung mit bewährten In-vitro-Verfahren nachweisen (17). Darüber hinaus sollten Testbenutzer eine historische Datenbank der mit den Reaktivitätstests (siehe Abschnitt 15) und mit den positiven and Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen (siehe Abschnitte 21–24) erzeugten Daten pflegen und diese Daten nutzen, um zu bestätigen, dass die Reproduzierbarkeit des Tests in ihrem Labor mit der Zeit aufrechterhalten wird.

**VERFAHREN**

13. Die Standardarbeitsanweisung (SOP) für den IL-8-Luc-Test ist verfügbar und sollte bei der Durchführung des Tests verwendet werden (18). Labore, die der Durchführung des Tests zugestimmt haben, können die rekombinante THP-G8-Zelllinie von

GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, nach Unterzeichnung einer Materialübertragungsvereinbarung (MTA) in Übereinstimmung mit den Bedingungen der OECD-Vorlage erhalten. Nachfolgend werden die Hauptkomponenten und Verfahren des Tests beschrieben.

### Vorbereitung der Zellen

14. Die THP-G8-Zelllinie vom GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, sollte für die Durchführung des IL-8-Luc-Tests verwendet werden (siehe Abschnitte 8 und 13). Bei Erhalt werden die Zellen gewonnen (2 bis 4 Passagen) und als homogener Stamm eingefroren aufbewahrt. Zellen von diesem Stamm können bis zu einem Höchstwert von 12 Passagen oder maximal 6 Wochen gewonnen werden. Das für die Vermehrung verwendete Medium ist das RPMI-1640-Kulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS), antibiotischer/antimyzotischer Lösung (100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin und 0,25 µg/ml Amphotericin B in 0,85 % Kochsalzlösung) (z. B. GIBCO Kat. Nr. 15240-062), 0,15 µg/ml Puromycin (z. B. CAS:58-58-2) und 300 µg/ml G418 (z. B. CAS:108321-42-2).
15. Vor ihrer Verwendung zu Testzwecken sollten die Zelle qualifiziert werden, indem ein Reaktivitätstest durchgeführt wird. Dieser Test sollte 1–2 Wochen oder 2–4 Passagen nach dem Auftauen mithilfe einer Positivkontrolle, 4-Nitrobenzylbromid (4-NBB) (CAS:100-11-8,  $\geq 99$  % Reinheit) und der Negativkontrolle Milchsäure (LA) (CAS:50-21-5,  $\geq 85$  % Reinheit) durchgeführt werden. 4-NBB sollte eine positive Wirkung auf Ind-IL8LA ( $\geq 1,4$ ) hervorrufen, während LA eine negative Wirkung auf Ind-IL8LA ( $< 1,4$ ) hervorrufen sollte. Nur Zellen, die den Reaktivitätstest bestehen, werden für den Test verwendet. Der Test sollte gemäß den in den Abschnitten 22–24 beschriebenen Verfahren durchgeführt werden.
16. Zu Testzwecken werden THP-G8-Zellen bei einer Dichte von 2 bis  $5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät und 48 bis 96 Stunden in Kulturkolben vorgezchtet. Am Tag des Tests werden die vom Kulturkolben geernteten Zellen mit RPMI-1640 mit 10 % FBS ohne Antibiotika gewaschen und anschließend mit RPMI-1640 mit 10 % FBS ohne Antibiotika bei  $1 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Die Zellen werden dann in einer flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden (z. B. Costar Kat. Nr. 3603) mit 50 µl ( $5 \times 10^4$  Zellen/well) verteilt.

### Vorbereitung der Prüfchemikalie und Kontrollstoffe

17. Die Prüfchemikalie sowie die Kontrollstoffe werden am Tag des Tests vorbereitet. Bei dem IL-8-Luc-Test werden Prüfchemikalien in X-VIVO™ 15 gelöst, einem im Handel erhältlichen, serumfreien Medium (Lonza, 04-418Q), bis eine endgültige Konzentration von 20 mg/ml erreicht wurde. X-VIVO™ 15 wird in einem Mikrozentrifugenröhrchen zu 20 mg/ml der Prüfchemikalie hinzugefügt (unabhängig von der Löslichkeit der Chemikalie) und auf ein Volumen von 1 ml gebracht und dann kräftig geschüttelt und auf einem Rotor bei einer Höchstgeschwindigkeit von 8 U/min 30 Minuten lang bei einer Umgebungstemperatur von ungefähr 20 °C geschüttelt. Wenn feste Chemikalien noch immer nicht löslich sind, wird das Röhrchen darüber hinaus im Ultraschallbad behandelt, bis die Chemikalie sich komplett gelöst hat oder stabil verteilt wurde. Bei Prüfchemikalien, die in X-VIVO™ 15 löslich sind, wird die Lösung mit einem Faktor von 5 mit X-VIVO™ 15 verdünnt und dann als X-VIVO™ 15-Stammlösung der Prüfchemikalie verwendet (4 mg/ml). Bei Prüfchemikalien, die nicht in X-VIVO™ 15 löslich sind, wird das Gemisch erneut mindestens 30 Minuten lang rotiert und dann bei 15000 U/min ( $\approx 20000$  g) 5 Minuten lang zentrifugiert; das sich daraus ergebende Tensid wird als X-VIVO™ 15-Stammlösung der Prüfchemikalie verwendet. Für den Einsatz anderer Lösungsmittel wie DMSO, Wasser oder Kulturmedium sollten ausreichende wissenschaftliche Gründe vorgelegt werden. Das detaillierte Verfahren zur Lösung von Chemikalien wird in Anlage 3.5 dargestellt. Die X-VIVO™ 15-Lösungen, die in den Abschnitten 18–23 beschrieben werden, werden 1:1 (v/v) mit den in der flachen Platte mit 96 Mulden vorbereiteten Zellsuspensionen gemischt (siehe Abschnitt 16).
18. Der erste Testdurchlauf zielt darauf ab, die zytotoxische Konzentration zu bestimmen und das Hautsensibilisierungspotenzial der Chemikalien zu untersuchen. Mithilfe von X-VIVO™ 15 werden serielle Verdünnungen der X-VIVO™ 15-Stammlösungen der Prüfchemikalien mit einem Verdünnungsfaktor von zwei (siehe Anlage 3.5) in einem Testblock mit 96 Mulden (z. B. Costar Kat. Nr. EW-01729-03) hergestellt. Dann werden 50 µl/Mulde verdünnte Lösung zu 50 µl der Zellsuspension in einer flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden hinzugefügt. Damit reicht die endgültige Konzentration für Prüfchemikalien, die in X-VIVO™ 15 löslich sind, von 0,002 bis 2 mg/ml (Anlage 3.5). Bei Prüfchemikalien, die bei 20 mg/ml nicht in X-VIVO™ 15 löslich sind, werden nur die Verdünnungsfaktoren bestimmt, die von 2 bis  $2^{10}$  reichen, obwohl die tatsächlichen endgültigen Konzentrationen der Prüfchemikalien unbestimmt bleiben und von der gesättigten Konzentration der Prüfchemikalien in der X-VIVO™ 15-Stammlösung abhängen.

19. In nachfolgenden Testdurchläufen (d. h. das zweite, dritte und vierte Replikat) wird die X-VIVO™ 15-Stammlösung im ersten Versuch bei einer Konzentration hergestellt, die 4 Mal höher ist als die Konzentration der Zellviabilität 05 (CV05; die niedrigste Konzentration, bei der Inh-GAPLA < 0,05 wird). Wenn Inh-GAPLA bei der höchsten Konzentration im ersten Durchlauf nicht unter 0,05 fällt, wird die X-VIVO™ 15-Stammlösung bei der höchsten Konzentration im ersten Durchlauf hergestellt. Die Konzentration von CV05 wird berechnet, indem die Konzentration der Stammlösung im ersten Durchlauf durch den Verdünnungsfaktor für CV05 (X) (Verdünnungsfaktor CV05 (X) geteilt wird; der Verdünnungsfaktor, der erforderlich ist, um die Stammlösung auf CV05 zu verdünnen) (siehe Anlage 3.5). Bei Prüfstoffen, die bei 20 mg/ml nicht in X-VIVO löslich sind, wird CV05 anhand der Konzentration der Stammlösung  $\times 1/X$  bestimmt. Für die Durchläufe 2 bis 4 wird eine zweite Stammlösung wie  $4 \times CV05$  vorbereitet (Anlage 3.5).
20. Serielle Verdünnungen der zweiten X-VIVO™ 15-Stammlösungen werden mit einem Verdünnungsfaktor von 1,5 mit einem Testblock mit 96 Mulden hergestellt. Dann werden 50  $\mu$ l/Mulde verdünnte Lösung zu 50  $\mu$ l der Zellsuspension in den Mulden einer flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden hinzugefügt. Jede Konzentration jeder Prüfchemikalie sollte in 4 Mulden geprüft werden. Die Proben werden dann auf einem Platten-Schüttler gemischt und 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gemischt und anschließend wird die Luciferase-Aktivität wie unten beschrieben gemessen.
21. Die Lösungsmittelkontrolle ist das Gemisch von 50  $\mu$ l/Mulde von X-VIVO™ 15 und 50  $\mu$ l/Mulde der Zellsuspension in RPMI-1640 mit 10 % FBS.
22. Die empfohlene Positivkontrolle ist 4-NBB. 20 mg von 4-NBB werden in einem 1,5-ml-Mikrofugenröhrchen vorbereitet, zu dem X-VIVO™ 15 bis auf 1 ml hinzugefügt wird. Das Röhrchen wird kräftig geschüttelt und auf einem Rotor bei einer Höchstgeschwindigkeit von 8 U/min mindestens 30 Minuten lang geschüttelt. Nach der Zentrifugierung bei 20000 g für 5 Minuten wird das Tensid mit einem Faktor von 4 mit X-VIVO™ 15 verdünnt und 500  $\mu$ l des verdünnten Tensids werden in eine Mulde in einem Testblock mit 96 Mulden übertragen. Das verdünnte Tensid wird mit X-VIVO™ 15 mit Faktoren von 2 und 4 weiter verdünnt und 50  $\mu$ l der Lösung wird zu 50  $\mu$ l der THP-G8-Zellsuspension in den Mulden der flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden hinzugefügt (Anlage 3.6). Jede Konzentration der Positivkontrolle sollte in 4 Mulden geprüft werden. Die Platte wird auf einem Platten-Schüttler geschüttelt und in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator 16 Stunden lang inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), anschließend wird die Luciferase-Aktivität wie in Abschnitt 29 beschrieben gemessen.
23. Die empfohlene Negativkontrolle ist LA. 20 mg von LA werden in einem 1,5-ml-Mikrofugenröhrchen vorbereitet, zu dem X-VIVO™ 15 bis auf 1 ml hinzugefügt wird (20 mg/ml). 20 mg/ml der LA-Lösung werden um einen Faktor von 5 mit X-VIVO™ 15 verdünnt (4 mg/ml); 500  $\mu$ l dieser 4 mg/ml-LA-Lösung werden in eine Mulde eines Testblocks mit 96 Mulden übertragen. Diese Lösung wird um einen Faktor von 2 mit X-VIVO™ 15 verdünnt und dann erneut um einen Faktor von 2 verdünnt, um 2 mg/ml- und 1 mg/ml-Lösungen herzustellen. 50  $\mu$ l dieser 3 Lösungen und Vehikelkontrollen (X-VIVO™ 15) werden zu 50  $\mu$ l der THP-G8-Zellsuspension in den Mulden der flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden hinzugefügt. Jede Konzentration der Negativkontrolle wird in 4 Mulden geprüft. Die Platte wird auf einem Platten-Schüttler geschüttelt und in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator 16 Stunden lang inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), anschließend wird die Luciferase-Aktivität wie in Abschnitt 29 beschrieben gemessen.
24. Andere geeignete Positiv- oder Negativkontrollen können verwendet werden, sofern historische Daten für die Ableitung vergleichbarer Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf zur Verfügung stehen.
25. Es ist darauf zu achten, dass eine Verdunstung der flüchtigen Prüfchemikalien sowie eine Kreuzkontamination zwischen Mulden durch die Prüfchemikalien vermieden werden, indem die Platte beispielsweise vor der Inkubation mit den Prüfchemikalien versiegelt wird.
26. Bei den Prüfchemikalien und der Lösungsmittelkontrolle sind 2 bis 4 Durchläufe erforderlich, um eine positive oder negative Vorhersage ableiten zu können (siehe Tabelle 2). Jeder Durchlauf wird an einem anderen Tag mit einer frischen X-VIVO™ 15-Stammlösung der Prüfchemikalie und unabhängig voneinander gewonnenen Zellen vorgenommen. Die Zellen können aus derselben Passage stammen.

### Messungen der Luciferase-Aktivität

27. Die Lumineszenz wird mithilfe eines Mikroplattenluminometers mit 96 Mulden gemessen, das mit optischen Filtern ausgestattet ist, z. B. Phelios (ATTO, Tokyo, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) und die ARVO-Serie (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Das Luminometer muss für jeden Test kalibriert werden, um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten (19). Rekombinante orange und rot emittierende Luciferasen sind für diese Kalibrierung verfügbar.
28. 100 µl des vorgewärmten Tripluc® Luciferase-Test-Reagenz (Tripluc) wird in jede Mulde der Platte übertragen, die die mit oder ohne Chemikalien behandelte Zellsuspension enthält. Die Platte wird 10 Minuten lang bei einer Umgebungstemperatur von ungefähr 20 °C geschüttelt. Die Platte wird auf dem Luminometer platziert, um die Luciferase-Aktivität zu messen. Die Biolumineszenz wird jeweils 3 Sekunden lang in der Abwesenheit (F0) und Anwesenheit (F1) des optischen Filters gemessen. Bei Verwendung anderer Einstellungen, z. B. je nach verwendetem Luminometermodell, sollten diese begründet werden.
29. Parameter für jede Konzentration werden aus den gemessenen Werten berechnet, z. B. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, die mittlere ±SD von IL8LA, die mittlere ±SD von GAPLA, die mittlere ±SD von nIL8LA, die mittlere ±SD von Ind-IL8LA, die mittlere ±SD von Inh-GAPLA und das 95 % Konfidenzintervall von Ind-IL8LA. Definitionen der in diesem Abschnitt verwendeten Parameter werden in den Anlagen 3.1 bzw. 3.4 bereitgestellt.
30. Vor der Messung wird die Farbumterscheidung in mehrfarbigen Reporter-Tests allgemein durch die Verwendung von Detektoren erzielt (Luminometer und Plattenleser), die mit optischen Filtern ausgestattet sind, wie beispielsweise Short-Cut-Filtern (Langpass oder Kurzpass) oder Bandpassfiltern. Die Übertragungskoeffizienten der Filter für jede Biolumineszenzsignalfarbe sollte vor dem Test gemäß Anlage 3.2 kalibriert werden.

### DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

#### Datenauswertung

31. Kriterien für eine positive/negative Entscheidung erfordern, dass in jedem Durchlauf:
  - eine IL-8-Luc-Test-Vorhersage als positiv eingestuft wird, wenn eine Prüfchemikalie über einen Ind-IL8LA  $\geq$  von 1,4 verfügt und die untere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls von Ind-IL8LA  $\geq$  1,0 beträgt
  - eine IL-8-Luc-Test-Vorhersage als negativ eingestuft wird, wenn eine Prüfchemikalie über einen Ind-IL8LA  $<$  1,4 verfügt und/oder die untere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls von Ind-IL8LA  $<$  1,0 beträgt

#### Vorhersagemodell

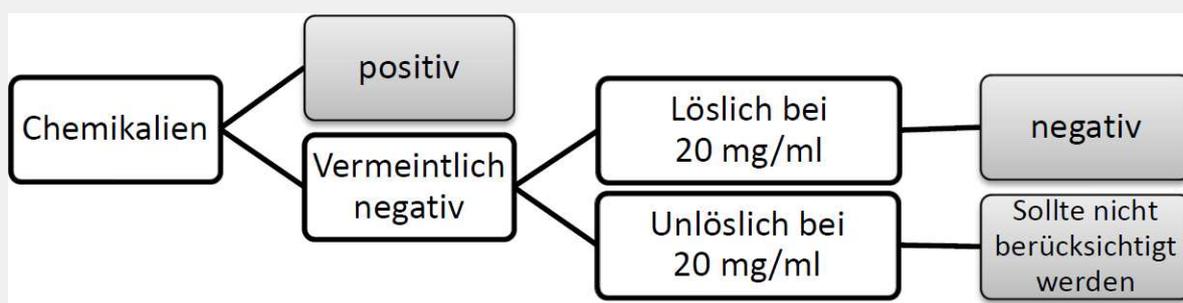
32. Prüfchemikalien, die zwei positive Ergebnisse in den 1., 2., 3. oder 4. Durchläufen liefern, werden als positiv identifiziert, während diejenigen, die drei negative Ergebnisse in den 1., 2., 3. oder 4. Durchläufen liefern, als vermeintlich negativ identifiziert werden (Tabelle 2). Unter den vermeintlich negativen Chemikalien werden Chemikalien, die bei 20 mg/ml von X-VIVO™ 15 gelöst werden, als negativ eingestuft, während Chemikalien, die nicht bei 20 mg/ml von X-VIVO™ 15 gelöst werden, nicht berücksichtigt werden sollten (Abbildung 1).

Tabelle 2

**Kriterien zur Identifizierung von positiv und vermeintlich negativ**

1. Durchlauf	2. Durchlauf	3. Durchlauf	4. Durchlauf	Endgültige Vorhersage
positiv	positiv	–	–	positiv
	negativ	positiv	–	positiv
		negativ	positiv	positiv
			negativ	Vermeintlich negativ
negativ	positiv	positiv	–	positiv
		negativ	positiv	positiv
		negativ	Vermeintlich negativ	
	negativ	positiv	positiv	positiv
			negativ	Vermeintlich negativ
		negativ	–	Vermeintlich negativ

Abb. 1

**Vorhersagemodell für endgültiges Urteil****Akzeptanzkriterien**

33. Bei der Verwendung des IL-8-Luc-Tests sollten die folgenden Akzeptanzkriterien erfüllt werden:

- Ind-IL8LA sollte in mindestens einer Konzentration der Positivkontrolle, 4-NBB, in jedem Durchlauf mehr als 5,0 betragen.
- Ind-IL8LA sollte in jeder Konzentration der Negativkontrolle, Milchsäure, in jedem Durchlauf weniger als 1,4 betragen.

- Daten aus Platten, für die die GAPLA der Kontrollmulden mit Zellen und Tripluc aber ohne Chemikalien weniger als 5 Mal des Wertes der Mulde, die nur das Prüfmedium enthält (50 µl/Mulde von RPMI-1640 mit 10 % FBS und 50 µl/Mulde von X-VIVO™ 15), beträgt, sollten abgelehnt werden.
- Daten aus Platten, für die die Inh-GAPLA aller Konzentrationen des Tests oder Kontrollchemikalien weniger als 0,05 beträgt, sollten abgelehnt werden. In diesem Fall sollte der erste Test wiederholt werden, damit die höchste endgültige Konzentration des wiederholten Tests die niedrigste endgültige Konzentration des vorherigen Tests ist.

### **Prüfbericht**

34. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

#### *Prüfchemikalien*

Einkomponentiger Stoff:

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
- Aussehen, Wasserlöslichkeit, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- Löslichkeit in X-VIVO™ 15. Bei Chemikalien, die in X-VIVO™ 15 nicht löslich sind, ob ein Niederschlag oder ein Aufschwimmen nach der Zentrifugierung beobachtet wird;
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie, wenn X-VIVO™ 15 nicht verwendet wurde.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoff und Gemisch:

- Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Komponenten, soweit verfügbar;

- Physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;
- Molekulargewicht oder scheinbares Molekulargewicht im Fall von Gemischen/ Polymeren mit bekannter Zusammensetzung oder andere für die Durchführung der Studie relevante Informationen;
- Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- Löslichkeit in X-VIVO™ 15. Bei Chemikalien, die in X-VIVO™ 15 nicht löslich sind, ob ein Niederschlag oder ein Aufschwimmen nach der Zentrifugierung beobachtet wird;
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar.
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie, wenn X-VIVO™ 15 nicht verwendet wurde.

#### *Kontrollen*

##### Positivkontrolle:

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
- physikalisches Erscheinungsbild, Löslichkeit in Wasser, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern verfügbar und falls zutreffend;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- ggf. Verweis auf historische Ergebnisse von Positivkontrollen, die geeignete Akzeptanzkriterien dokumentieren.

##### Negativkontrolle:

- Chemische Kennung, wie beispielsweise IUPAC- oder CAS-Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n) und/oder sonstige Kennungen;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

- physikalisches Erscheinungsbild, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, falls andere als die in der Prüfrichtlinie genannten Negativkontrollen verwendet werden, und sofern verfügbar;
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels für jede Prüfchemikalie.

#### *Prüfbedingungen*

- Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;
- Beschreibung des verwendeten Prüfprotokolls;
- verwendete Zelllinie, zugehörige Lagerbedingungen und Quelle (z. B. Einrichtung, von der sie gewonnen wurde);
- Chargennummer und Herkunft von FBS, Lieferantename, Chargennummer der flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden und Chargennummer des Tripluc-Reagenz;
- Passagenanzahl und Zelldichte für den Test;
- angewandte Zellzählungsmethode bei der Beimpfung vor dem Test und ergriffene Maßnahmen zur Gewährleistung einer homogenen quantitativen Verteilung der Zellen;
- verwendetes Luminometer (z. B. Modell), einschließlich Geräteeinstellungen, verwendetes Luciferase-Substrat und Nachweis geeigneter Lumineszenzmessungen basierend auf der in Anlage 3.2 beschriebenen Kontrollprüfung;
- angewandtes Verfahren zum Nachweis der Leistungsfähigkeit des Labors hinsichtlich der Durchführung des Tests (z. B. durch Prüfen von Leistungsstoffen) oder zum Nachweis der reproduzierbaren Durchführung des Tests im Zeitverlauf.

#### *Prüfverfahren*

- Anzahl an Replikaten und ausgeführten Durchläufen;
- Konzentrationen der Prüfchemikalie, Applikationsverfahren und Expositionsdauer (falls von den Empfehlungen abweichend);
- Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;
- Beschreibung der angewandten Studienakzeptanzkriterien;
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren.

### Ergebnisse

- Messungen von IL8LA und GAPLA;
- Berechnungen für nIL8LA, Ind-IL8LA und Inh-GAPLA;
- das 95 %ige Konfidenzintervall von Ind-IL8LA;
- Diagramm zur Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven für die Induktion der Luciferase-Aktivität und Viabilität;
- Beschreibung etwaiger sonstiger relevanter Beobachtungen, falls zutreffend.

### Erörterung der Ergebnisse

- Erörterung der anhand des IL-8-Luc-Tests erhaltenen Ergebnisse;
- Erörterung der Test-Ergebnisse im Rahmen eines IATA, sofern andere sachdienliche Informationen verfügbar sind.

### Schlussfolgerung

#### LITERATURHINWEISE

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359–69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371–9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816–30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337–51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 38:275–84.
- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? *Regul Toxicol Pharmacol*, 82:147–155.
- (10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* 17:646–57.
- (11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1286–91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38:8271–9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38:891–4.
- (15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, Frankreich

- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, Frankreich.
- (17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD\\_Final\\_Draft\\_GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf).
- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Verfügbar unter: [http://www.jacvam.jp/en\\_effort/effort02.html](http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html).
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046–9.
- (20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, Frankreich.
- (21) Vereinte Nationen (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sechste überarbeitete Fassung. New York und Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Verfügbar unter: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html).

## Anlage 3.1

## DEFINITIONEN

**Genauigkeit:** Grad der Übereinstimmung zwischen Prüfergebnissen und anerkannten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der „Relevanz“. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse eines Tests (16).

**AOP (Adverse Outcome Pathway):** Abfolge von Vorgängen, ausgehend von der chemischen Struktur einer Zielchemikalie oder Zielgruppe ähnlicher Chemikalien, über den molekularen auslösenden Vorgang bis hin zu einem In-vivo-Ergebnis von Interesse (20).

**Chemikalie:** Stoff oder Gemisch.

**CV05:** Zellviabilität 05, d. h. die Mindestkonzentration, bei der die Chemikalien weniger als 0,05 von Inh-GAPLA aufweisen.

**FinSLO-LA:** Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf Ind-IL8LA zu beziehen. Siehe Ind-IL8LA für eine Definition.

**GAPLA:** Luciferase-Aktivität der „Stable Luciferase Red (SLR)“ ( $\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$ ), reguliert durch den GAPDH-Träger und zeigt die Zellviabilität und die Anzahl der lebensfähigen Zellen auf.

**Gefahr:** Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder einer Situation, potenziell schädigende Auswirkungen zu haben, wenn ein Organismus, ein System oder eine (Teil-)Population diesem Stoff ausgesetzt ist.

**IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment):** Ein strukturierter Ansatz zur Gefahrenidentifizierung (Potenzial), Gefahrencharakterisierung (Potenz) und/oder Sicherheitsbeurteilung (Potenzial/Potenz und Exposition) einer Chemikalie oder Gruppe von Chemikalien, der strategisch sämtliche relevanten Daten für eine informierte regulatorische Entscheidung hinsichtlich potenziellen Gefahren und/oder Risiken und/oder des Bedürfnisses weiterer gezielter und somit minimaler Tests integriert und abwägt.

**II-SLR-LA:** Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf Inh-GAPLA zu beziehen. Siehe Inh-GAPLA für eine Definition

**IL-8 (Interleukin-8):** Ein aus Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Makrophagen und Monozyten abgeleitetes Zytokin, das Chemotaxis von Neutrophilen und T-Zell-Lymphozyten verursacht.

**IL8LA:** Luciferase-Aktivität von „Stable Luciferase Orange (SLO)“ ( $\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$ ), reguliert durch IL-8-Träger.

**Ind-IL8LA:** n-fache Induktion von nIL8LA. Der Wert wird erhalten, indem der nIL8LA der THP-G8-Zellen, die mit Chemikalien behandelt wurden, durch den der nicht stimulierten THP-G8-Zellen geteilt wird und die Induktion der IL-8-Trägeraktivität durch Chemikalien darstellt.

**Inh-GAPLA:** Hemmung von GAPLA. Der Wert wird erhalten, indem GAPLA des mit Chemikalien behandelten THP-G8 durch GAPLA des nicht behandelten THP-G8 geteilt wird und die Zytotoxizität der Chemikalien darstellt.

**Minimaler Induktionsschwellenwert (MIT):** die niedrigste Konzentration, bei der eine Chemikalie die positiven Kriterien erfüllt

**Gemisch:** Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehreren Stoffen besteht.

**Einkomponentiger Stoff:** Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorhanden ist.

**Mehrkomponentiger Stoff:** Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von  $\geq 10$  % w/w und  $< 80$  % w/w vorhanden sind. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

**nIL8LA:** Die SLO-Luciferase-Aktivität, die die IL-8-Trägeraktivität (IL8LA) widerspiegelt, die durch die SLR-Luciferase-Aktivität normalisiert wird, die die GAPDH-Trägeraktivität (GAPLA) widerspiegelt. Der Wert stellt die IL-8-Trägeraktivität nach Berücksichtigung der Zellviabilität oder der Zellanzahl dar.

**nSLO-LA:** Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf nIL8LA zu beziehen. Siehe nIL8LA für eine Definition

**Positivkontrolle:** Ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

**Prähaptene:** Chemikalien, die durch abiotische Transformation zu Allergenen werden.

**Prohaptene:** Chemikalien, die eine enzymatische Aktivierung erfordern, um ihr Hautsensibilisierungspotenzial auszuschöpfen.

**Relevanz:** Beschreibung der Beziehung zwischen dem Test und der untersuchten Wirkung und ob der Test aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Die Relevanz gibt an, inwieweit der Test die untersuchte biologische Wirkung richtig misst oder vorhersagt. Die Relevanz umfasst die Einbeziehung der Genauigkeit (Übereinstimmung) eines Tests (16).

**Zuverlässigkeit:** Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Labors über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit und Intralabor-Wiederholbarkeit bewertet (16).

**Durchlauf:** Ein Durchlauf besteht aus einer oder mehreren hintereinander getesteten Prüfchemikalien mit einer Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle und mit einer Positivkontrolle.

**Sensitivität:** Der Anteil aller positiven/wirkungsvollen Chemikalien, die durch den Test korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (16).

**SLO-LA:** Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf IL8LA zu beziehen. Siehe IL8LA für eine Definition.

**SLR-LA:** Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf GAPLA zu beziehen. Siehe GAPLA für eine Definition.

**Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle:** Eine unbehandelte Probe, die sämtliche Komponenten eines Prüfsystems enthält, außer der Prüfchemikalie, aber einschließlich des verwendeten Lösungsmittels/Vehikels. Sie wird verwendet, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst oder stabil verteilt wurden, zu bestimmen. Wenn mit einer simultanen Medienkontrolle geprüft wird, zeigt diese Probe außerdem, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

**Spezifität:** Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (16).

**Stoff:** Chemische Elemente und ihre Verbindungen in natürlicher Form oder durch ein Produktionsverfahren hergestellt, einschließlich der zur Wahrung der Produktstabilität erforderlichen Zusatzstoffe und der bei der Herstellung entstehenden Verunreinigungen, mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

**Tensid:** Dies eine Substanz, auch oberflächenaktives Mittel genannt, wie z. B. ein Waschmittel, die die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit reduzieren und ihr somit ermöglichen kann, zu schäumen oder Feststoffe zu durchdringen; ein Tensid wird auch als Netzmittel bezeichnet. (TG437)

**Prüfchemikalie:** Stoffe oder Gemische, die mit dieser Methode geprüft wurden.

**THP-G8:** Eine IL-8-Reporter-Zelllinie, die im IL-8-Luc-Test verwendet wird. Die humane makrophagenähnliche Zelllinie THP-1 wurde unter der Kontrolle der IL-8- bzw. GAPDH-Träger mit den SLO- und SLR-Luciferasegenen transfiziert.

**Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN-GHS):** Ein System, das die Einstufung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) gemäß normierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und Umweltgefahren vorschlägt und entsprechende Kommunikationselemente wie Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenberichte, Berichte zu Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitsdatenblätter anspricht, damit Informationen zu Nebenwirkungen mit Blick auf den Schutz von Menschen (einschließlich Mitarbeitern, Arbeitern, Logistikern, Verbrauchern und Ersthelfern) und der Umwelt zu übermitteln (21).

**UVCB:** Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

**Gültige Prüfmethode:** Ein Test, von der angenommen wird, dass sie über ein ausreichendes Maß an Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck verfügt und die auf wissenschaftlich bewährten Prinzipien basieren. Ein Test ist niemals in einem absoluten Sinn gültig, sondern im Verhältnis zu einem definierten Zweck.

## Anlage 3.2

## GRUNDSATZ DER MESSUNG DER LUCIFERASE-AKTIVITÄT UND BESTIMMUNG DER ÜBERTRAGUNGSKOEFFIZIENTEN DES OPTISCHEN FILTERS FÜR SLO UND SLR

Das MultiReporter-Prüfsystem -Tripluc- kann mit einem Luminometer des Typs Mikroplatte mit einem mehrfarbigen Erkennungssystem verwendet werden, das einen optischen Filter ausstatten kann (z. B. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Der bei Messungen verwendete optische Filter ist ein 600–620 nm Lang- oder Kurzpassfilter oder ein 600–700 nm Bandpassfilter.

**Messung der zweifarbigen Luciferasen mit einem optischen Filter.**

Dies ist ein Beispiel, das Phelios AB-2350 (ATTO) verwendet. Dieses Luminometer ist mit einem 600 nm Langpassfilter (R60 HOYA Co., 600 nm LP, Filter 1) zum Splitten der SLO- ( $\lambda_{\max} = 580$  nm) und SLR-Lumineszenz ( $\lambda_{\max} = 630$  nm) ausgestattet.

Um die Übertragungskoeffizienten des 600 nm LP zu bestimmen muss zuerst mit aufbereiteten SLO- und SLR-Luciferase-Enzymen i) die SLO- und SLR-Biolumineszenzintensität ohne Filter (F0), ii) die SLO- und SLR-Biolumineszenzintensität, die durch den 600 nm LP (Filter 1) passiert ist, gemessen werden und iii) die Übertragungskoeffizienten des 600 nm LP für die unten aufgeführten SLO und SLR berechnet werden.

Übertragungskoeffizienten		Abkürzung	Definition
SLO	Filter 1 Übertragungskoeffizient	$\kappa_{O_{R60}}$	Definition Übertragungskoeffizient des Filters für die SLO
SLR	Filter 1 Übertragungskoeffizient	$\kappa_{R_{R60}}$	Definition Übertragungskoeffizient des Filters für die SLR

Wenn die Intensität von SLO und SLR in Prüfproben als O bzw. R definiert ist, werden i) die Intensität des Lichts ohne Filter (alle optisch) F0 und ii) die Intensität des Lichts, das durch den 600 nm LP (Filter 1) F1 geschickt wird, wie unten beschrieben.

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa_{O_{R60}} \times O + \kappa_{R_{R60}} \times R$$

Diese Formeln können wie folgt umformuliert werden:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa_{O_{R60}} & \kappa_{R_{R60}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Dann können anhand der berechneten Transmissionsfaktoren ( $\kappa_{O_{R60}}$  und  $\kappa_{R_{R60}}$ ) der gemessenen F0 and F1 die O- und R-Werte wie folgt berechnet werden:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

## Materialien und Methoden zur Bestimmung des Transmissionsfaktors

### (1) Reagenzien

Einzelne aufbereitete Luciferase-Enzyme:

Lyophilisiertes aufbereitetes SLO-Enzym

Lyophilisiertes aufbereitetes SLR-Enzym

(die für die Validierungsarbeiten von GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan mit THP-G8-Zelllinie erhalten wurden)

Test-Reagenz:

Tripluc® Luciferase-Test-Reagenz (zum Beispiel aus TOYOBO Kat. Nr. MRA-301)

Medium: für Luciferase-Test (30 ml, gelagert bei 2–8°C)

Reagenz	Konz.	Finale Konz. in Medium	Erforderliche Menge
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

### (2) Herstellung der Enzymlösung

Das lyophilisierte, aufbereitete Luciferase-Enzym im Röhrchen lösen, indem 200 µl 10 ~ 100 mM Tris/HCl oder HEPES/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) mit 10 % (w/v) Glycerol hinzugefügt werden, die Enzymlösung in 10 µl Aliquoten in Einwegröhrchen mit einem Volumen von 1,5 ml aufgeteilt wird und diese bei -80 °C in einem Gefrierschrank gelagert werden. Die gefrorene Enzymlösung kann bis zu 6 Monate verwendet werden. Wenn es verwendet wird, dann 1 ml des Mediums für den Luciferase-Test (RPMI-1640 mit 10 % FBS) zu jedem Röhrchen mit den Enzymlösungen (verdünnte Enzymlösung) hinzufügen und diese auf Eis halten, um eine Deaktivierung zu verhindern.

### (3) Messung der Biolumineszenz

Tripluc®-Luciferase-Test-Reagenz (Tripluc) auftauen und bei Raumtemperatur entweder in einem Wasserbad oder bei Umgebungslufttemperatur aufbewahren. Das Luminometer 30 Minuten vor Beginn der Messungen einschalten, damit sich der Fotovervielfacher stabilisieren kann. 100 µl der verdünnten Enzymlösung in eine schwarze Platte mit 96 Mulden übertragen (flache Unterseite) (die SLO-Referenzprobe zu #B1, #B2, #B3, die SLR-Referenzprobe zu #D1, #D2, #D3). Anschließend 100 µl vorgewärmtes Tripluc mithilfe eines Pipetman in jede Mulde der Platte geben, die die verdünnte Enzymlösung enthält. Die Platte 10 Minuten lang bei Raumtemperatur (ca. 25 °C) mit einem Plattenschüttler schütteln. Die Luftblasen aus den Lösungen in den Mulden entfernen, wenn diese erscheinen. Die Platte im Luminometer platzieren, um die Luciferase-Aktivität zu messen. Die Biolumineszenz wird jeweils 3 Sekunden lang in der Abwesenheit (F0) und Anwesenheit (F1) des optischen Filters gemessen.

Der Übertragungskoeffizient des optischen Filters wurde wie folgt berechnet:

Übertragungskoeffizient (SLO ( $\kappa_{O_{R60}}$ ))= (Anz. B1 von F1+ Anz. B2 von F1+ Anz. B3 von F1) / (Anz. B1 von F0+ Anz. B2 von F0+ Anz. B3 von F0)

Übertragungskoeffizient (SLR ( $\kappa_{R60}$ ))= (Anz. D1 von F1+ Anz. D2 von F1+ Anz. D3 von F1) / (Anz. D1 von F0+ Anz. D2 von F0+ Anz. D3 von F0)

Die berechneten Transmissionsfaktoren werden für alle Messungen verwendet, die mit demselben Luminometer durchgeführt werden.

### **Qualitätskontrolle der Ausrüstung**

Es sollten die im IL-8-Luc-Protokoll beschriebenen Verfahren verwendet werden (18).

## Anlage 3.3

## LEISTUNGSTOFFE

Vor der routinemäßigen Anwendung des in dieser Anlage zu Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Labors ihre technische Leistungsfähigkeit demonstrieren, indem sie die erwartete IL-8-Luc-Vorhersage für die in Tabelle 1 empfohlenen 9 Stoffe ermitteln und die Werte, die in den betreffenden Referenzbereich fallen, bei mindestens 8 der 9 Leistungsstoffe bestimmen (ausgewählt, um den Reaktionsbereich für Hautsensibilisierungsgefahren zu repräsentieren). Weitere Auswahlkriterien betrafen die Erhältlichkeit der Stoffe im Handel, und dass qualitativ hochwertige In-vivo-Referenzdaten sowie qualitativ hochwertige In-vitro-Daten aus dem IL-8-Luc-Test verfügbar sind. Außerdem sind veröffentlichte Referenzdaten für den IL-8-Luc-Test verfügbar (6) (1).

Tabelle 1

**Empfohlene Stoffe zum Nachweis der technischen Leistungsfähigkeit beim IL-8-Luc-Test**

Leistungsstoffe	CAS Nr.	Zustand	Löslichkeit in X-VIVO15 bei 20 mg/ml	In-vivo-Vorhersage (1)	IL-8 Luc-Vorhersage (2)	Referenzbereich (µg/ml) (3)	
						CV <sub>05</sub> (4)	IL-8 Luc MIT (5)
2,4-Dinitrochlorbenzol	97-00-7	fest	unlöslich	Sensibilisator (extrem)	positiv	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehyd	50-00-0	flüssig	löslich	Sensibilisator (stark)	positiv	9–30	4–9
2-Mercaptobenzothiazol	149-30-4	fest	unlöslich	Sensibilisator (mäßig)	positiv	250–290	60–250
Ethylendiamin	107-15-3	flüssig	löslich	Sensibilisator (mäßig)	positiv	500–700	0,1–0,4
Ethylglykoldimethacrylat	97-90-5	flüssig	unlöslich	Sensibilisator (schwach)	positiv	> 2 000	0,04–0,1
4-Allylanisol (Estragol)	140-67-0	flüssig	unlöslich	Sensibilisator (schwach)	positiv	> 2 000	0,01–0,07
Streptomycinsulfat	3810-74-0	fest	löslich	Nichtsensibilisator	negativ	> 2 000	> 2 000
Glycerin	56-81-5	flüssig	löslich	Nichtsensibilisator	negativ	> 2 000	> 2 000
Isopropanol	67-63-0	flüssig	löslich	Nichtsensibilisator	negativ	> 2 000	> 2 000

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service

(1) Die In-vivo-Potenz wird unter Anwendung der von ECETOC vorgeschlagenen Kriterien abgeleitet (19).

(2) Basierend auf den historischen beobachteten Werten (1) (6).

(3) CV<sub>05</sub> und IL-8 Luc MIT wurden mithilfe der durch EPI Suite™ gegebenen Wasserlöslichkeit berechnet.

(4) CV<sub>05</sub>: die Mindestkonzentration, bei der die Chemikalien weniger als 0,05 von Inh-GAPLA aufweisen.

(5) MIT: die niedrigsten Konzentrationen, bei denen eine Chemikalie die positiven Kriterien erfüllt.

## Anlage 3.4

## INDIZES UND URTEILSKRITERIEN

**nIL8LA (nSLO-LA)**

Die j. Wiederholung (j = 1–4) der i. Konzentration (i = 0–11) wird für IL8LA (SLO-LA) bzw. GAPLA (SLR-LA) gemessen. Die normalisierte IL8LA wird bezeichnet als nIL8LA (nSLO-LA) und definiert als:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Dies ist die Grundmaßeinheit in diesem Test.

**Ind-IL8LA (FInSLO-LA)**

Die vielfache Steigerung der gemittelten nIL8LA (nSLO-LA) für die Wiederholung auf der i. Konzentration im Vergleich zu ihr bei der 0-Konzentration, Ind-IL8LA, ist die primäre Messung dieser Tests. Das Verhältnis wird durch die folgende Formel bestimmt:

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j} \right\}$$

Das Hauptlabor hat vorgeschlagen, dass ein Wert von 1,4 einem positiven Ergebnis für die geprüfte Chemikalie entspricht. Dieser Wert basiert auf der Untersuchung der historischen Daten des Hauptlabors. Das Datenmanagement-Team nutzte diesen Wert dann in allen Phasen der Validierungsstudie. Das primäre Ergebnis, Ind-IL8LA, ist das Verhältnis von 2 arithmetischen Mitteln, wie sie in der Gleichung dargestellt werden.

**95 % Konfidenzintervall (95 % CI)**

Das auf dem Verhältnis basierende 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) kann so eingeschätzt werden, dass es die Präzision dieser primären Ergebnismessung zeigt. Die untere Grenze des 95 % CI  $\geq 1$  zeigt an, dass die nIL8LA mit der i. Konzentration deutlich größer ist als die mit Lösungsmittelkontrolle. Es gibt verschiedene Arten, auf die das 95 % CI erstellt wird. Wir nutzten die Methode, die in dieser Studie als Fiellers Theorem bekannt ist. Das Theorem des 95 % Konfidenzintervalls wird aus der folgenden Formel erhalten:

$$\left[ \frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

Dabei gilt:

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$$

$$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2$$

$$n_{yi} = 4$$

$$\bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$$

$$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

$t_{0,975(v)}$  ist das 97,5te Perzentil der zentralen t-Verteilung mit dem  $v$  des Freiheitsgrades, wobei

$$v = \left( \frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left( \frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left( \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right)^2 / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

#### **Inh-GAPLA (II-SLR-LA)**

Die Inh-GAPLA ist ein Verhältnis der gemittelten GAPLA (SLR-LA) für die Wiederholung der  $i$ . Konzentration im Vergleich zu der mit Lösungsmittelkontrolle und dies wird folgendermaßen bestimmt:

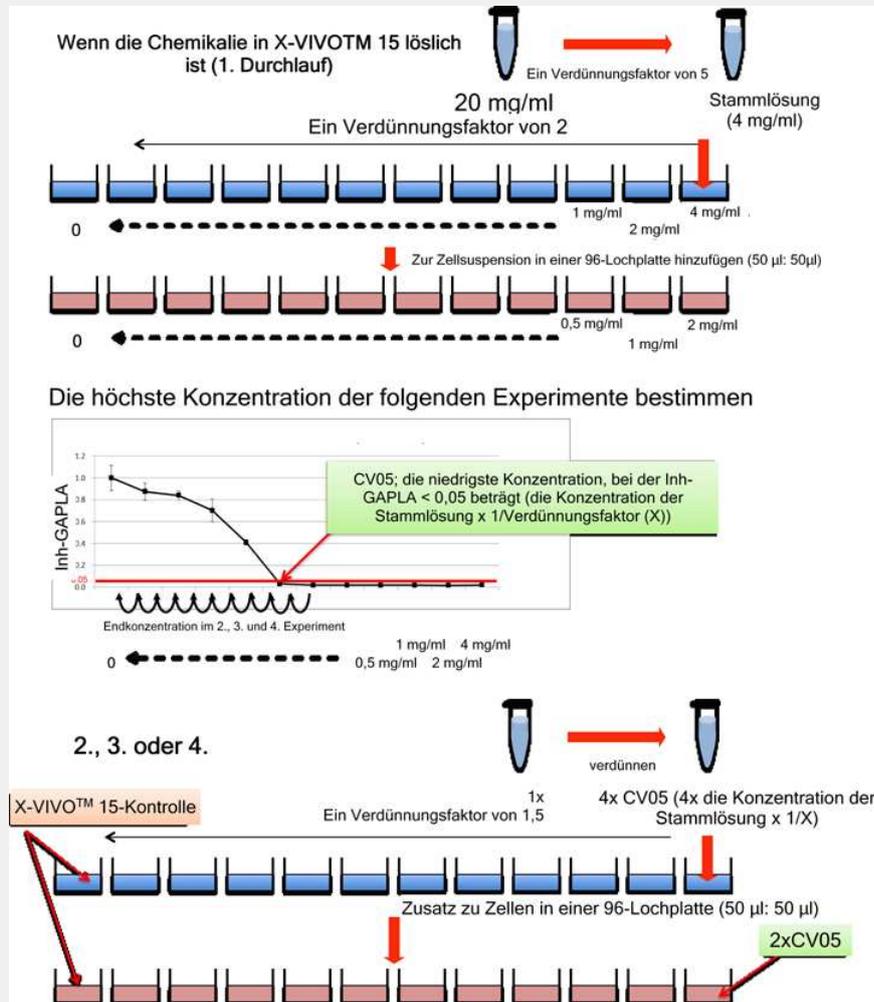
$$\text{Inh-GAPLA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j \text{GAPLA}_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j \text{GAPLA}_{0j} \right\}.$$

Da die GAPLA der Nenner der  $nIL8LA$  ist, verursacht ein extrem kleiner Wert eine große Schwankung der  $nIL8LA$ . Deshalb können Ind-IL8LA-Werte mit einem extrem kleinen Wert von Inh-GAPLA (weniger als 0,05) als eine schlechte Präzision angesehen werden.

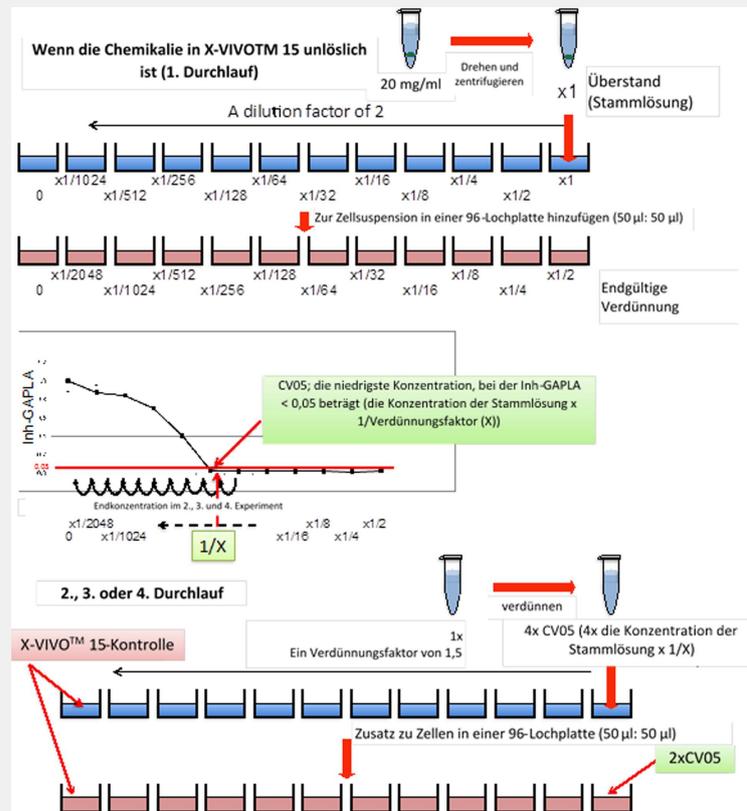
Anlage 3.5

DAS SCHEMA DER METHODEN ZUM LÖSEN VON CHEMIKALIEN FÜR DEN IL-8-LUC-TEST.

(a) Bei Chemikalien, die bei 20 mg/ml in X-VIVO™ 15 gelöst sind



(b) Bei Chemikalien, die bei 20 mg/ml in X-VIVO™ 15 unlöslich sind



Anlage 3.6

DAS SCHEMA DER METHODE ZUM LÖSEN VON 4-NBB FÜR DIE POSITIVKONTROLLE DES IL-8-LUC-TESTS.

