

Teil 3: Neue Entwicklungen

Development and Validation of Reconstructed Human Cornea Models for Eye Irritation Testing

Dr. Helena Kandarova

MatTek In Vitro Life Science Laboratories and MatTek Corporation

Mlynské Nivy 73, SK 82105 Bratislava

The recently implemented 7th Amendment to the EU Cosmetics Directive and the EU REACH legislation have heightened the need for in vitro ocular test methods covering broad range of irritation responses. While there are already validated and regulatory accepted methods for severe eye irritation testing (BCOP and ICE tests), the prediction of mild/moderate and non-irritating compounds and formulations by in vitro methods is not yet fully covered. To address this need, the EpiOcular™ Eye Irritation Test (EpiOcular-EIT), which utilizes primary, non transformed human cell-based EpiOcular tissue model, and SkinEthic™ Short Exposure Time/Long Exposure Time eye irritation test, which utilize immortalized, corneal cell line based SkinEthic HCE model, have been developed.

The EpiOcular-EIT is based on evidence, that most of the eye irritating chemicals do cause corneal injury of various depth and that cytotoxicity caused to the corneal tissue should correlate well with the overall irritation effect in most cases. The EpiOcular EIT uses a single exposure time combined with post-exposure period allowing for development of cytotoxic effect. Tissue viability is determined by the MTT assay. EpiOcular EIT comprises of two test protocols: protocol for liquids (30 min exposure followed by 2 hours post-exposure) and protocol for solids (90min exposure followed by 18 hour post exposure). A chemical is classified as an irritant, if the tissue viability is $\leq 60\%$, and as a non-irritant, if the viability is $> 60\%$.

The SkinEthic assay is based on assumption that chemicals can be divided into the two groups based on initial assessment of reactivity using Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Depending on the reactivity of chemicals, either Short Exposure Time (SET) protocol (10 min exposure followed by MTT viability test) or Long Exposure Time (LET) protocol (60 min exposure followed by 16-h postincubation period) is used to assess cytotoxicity. Tissue viability is determined by the MTT assay.

The EpiOcular and SkinEthic eye irritation tests were developed and pre-validated during 2004-2008, and are currently involved in a formal, multi-laboratory validation study sponsored by the European Cosmetics Association (COLIPA) under the auspices of the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

In addition to recent activities described above, in early 1990's, a protocol that utilizes EpiOcular ET-50 assay was developed by industry for testing of surfactants and formulations. Surfactants related validation study was performed with EpiOcular-ET50 protocol in 2003 and the data were



submitted to ECVAM for review in 2004 and resubmitted in 2009. In 2009, US EPA initiated investigation of the EpiOcular ET-50 protocol for assessment of antimicrobial cleaning products.

Recently EpiOcular FT model (containing epithelium and stroma layer) has been developed with the aim to enable assessment of advanced ocular toxicity studies. These would include e.g. recovery from the mild/moderate injury which was not possible to assess with currently pre-validated models.

In summary, reconstructed human corneal models belong to the most promising tools in assessment of eye irritation effects of chemicals and formulations in vitro. Ongoing validation studies performed by ECVAM should confirm high reproducibility, reliability and long-term positive industry experience with 3D models.



Teil 3: Neue Entwicklungen

Entwicklung von Krankheitsmodellen mit Hilfe menschlicher Hautmodelle

Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

Freie Universität Berlin, Fachbereich Pharmazie

Königin-Luise-Str. 2+4, D-14195 Berlin

Das Aufgreifen des Wunsches wesentlicher Teile der Gesellschaft nach dem Verzicht auf Tierversuche zur Prüfung von Kosmetika und ihren Inhaltsstoffen hat dazu geführt, daß die Entwicklung von In-vitro-Verfahren zur Erfassung substanzbedingter Risiken bei dermalen Exposition weit fortgeschritten ist. Im Sinn des Verbraucherschutzes fokussieren diese Methoden auf die normale Haut des gesunden Menschen und vernachlässigen Risiken, die bei Hauterkrankungen bzw. deren Vorstadien auftreten können. Dies erfordert spezielle Modelle, die sich dann aber auch für die präklinische Arzneimittelentwicklung eignen können. Damit gewinnt die Rekonstruktion kranker Haut in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Dazu eignen sich spezifische Abwandlungen der inzwischen als gut etabliert geltenden Methoden zur Rekonstruktion normaler Vollhaut durch Einbettung von humanen Fibroblasten in eine Kollagenmatrix, Überschichtung des Koriumäquivalents mit humanen Keratinozyten und Kultur über ca. 2 Wochen an der Luft-Medium-Grenze zur Induktion der Keratinozytendifferenzierung und Ausbildung eines Epidermisäquivalents.

Auf diese Weise können Hauttumoren durch Kokultur von normalen und transformierten Keratinozyten rekonstruiert werden, Applikation von Mikroorganismen eröffnet Wege zu Infektionsmodellen. Molekularpathologische und Therapie-Studien werden damit gleichermaßen möglich [Übersicht bei (Semlin et al, 2011)]. Läsionale Keratinozyten wiederum ermöglichen z.B. die Rekonstruktion des Hautzustands bei kongenitaler Ichthyose. Da Biopsien läsionaler Haut allerdings für Forschungszwecke noch weniger zur Verfügung stehen als normale Humanhaut, sind Alternativen erforderlich. Sofern die molekularen Grundlagen einer genetischen Erkrankung bekannt und von begrenzter Komplexität sind, kann z.B. die Ausschaltung entsprechender Gene erfolgen. Auf diese Weise gelingt z.B. die Rekonstruktion des Hautbildes bei kongenitaler Ichthyose (Oji et al, 2010), bei Peeling Skin Disease (Eckl et al, 2011) oder bei atopischer Dermatitis (Küchler et al, in press). Untersuchungen mit Standardsubstanzen zur Erfassung der Hautpenetration (z.B. Coffein, Testosteron) belegen ein erleichtertes Eindringen von Fremdstoffen und die verstärkte Reizwirkung von Natriumlaurylsulfat beim FLG-knock down-Modell (Küchler et al, in press) – entsprechend der besonderen Empfindlichkeit der Haut bei atopischer Dermatitis. Weitere Möglichkeiten zur Entwicklung von Modellen erkrankter Haut ergeben sich z.B. durch die Induktion von definierten Wunden an Konstrukten normaler Haut, z.B. mittels Laserstrahlung (Küchler et al, 2010), ein UV Erythem kann entsprechend mittels UV-Bestrahlung erzeugt werden, das Modell dient zur Testung von Lichtschutzmitteln (Bernerd & Asselineau, 2008; Duval et al, 2003). Damit eröffnen solche Krankheitsmodelle auch neue Optionen zur Testung von neuen Arzneistoffen bzw. von Formulierungen. Die kommenden Jahre werden zeigen, ob damit eine Einsparung von Tierversuchen und eine Beschleunigung der präklinischen Entwicklung gelingen und in wieweit sich diese Ansätze auf Erkrankungen anderer



Organe übertragen lassen. Optimistisch stimmt z.B. die Möglichkeit Kandidosemodelle von Vaginal- und Mundschleimhaut (Korting et al, 1998; Schaller et al, 2006) zu erstellen.

References

Bernerd F, Asselineau D (2008) An organotypic model of skin to study photodamage and photoprotection in vitro. *J Am Acad Dermatol* 58: S155-159

Duval C, Schmidt R, Regnier M, Facy V, Asselineau D, Bernerd F (2003) The use of reconstructed human skin to evaluate UV-induced modifications and sunscreen efficacy. *Exp Dermatol* 12 Suppl 2: 64-70

Eckl KM, Alef T, Torres S, Hennies HC (2011) Full-thickness human skin models for congenital ichthyosis and related keratinization disorders. *J Invest Dermatol* 131: 1938-1942

Korting HC, Patzak U, Schaller M, Maibach HI (1998) A model of human cutaneous candidosis based on reconstructed human epidermis for the light and electron microscopic study of pathogenesis and treatment. *J Infect* 36: 259-267

Küchler S, Henkes D, Eckl KM, Ackermann K, Plendl J, Korting HC, Hennies HC, Schäfer-Korting M (in press) The impact of filaggrin on skin barrier function – assessment via an atopic dermatitis in vitro skin disease model based on sirna knock down. *Skin Pharm Phys*

Küchler S, Wolf NB, Heilmann S, Weindl G, Helfmann J, Yahya MM, Stein C, Schäfer-Korting M (2010) 3D-wound healing model: influence of morphine and solid lipid nanoparticles. *J Biotechnol* 148: 24-30

Oji V, Eckl KM, Aufenvenne K, Natebus M, Tarinski T, Ackermann K, Seller N, Metze D, Nurnberg G, Folster-Holst R, Schäfer-Korting M, Hausser I, Traupe H, Hennies HC (2010) Loss of corneodesmosin leads to severe skin barrier defect, pruritus, and atopy: unraveling the peeling skin disease. *Am J Hum Genet* 87: 274-281

Schaller M, Zakikhany K, Naglik JR, Weindl G, Hube B (2006) Models of oral and vaginal candidiasis based on in vitro reconstituted human epithelia. *Nat Protoc* 1: 2767-2773

Semlin L, Schäfer-Korting M, Borelli C, Korting HC (2011) In vitro models for human skin disease. *Drug Discov Today* 16: 132-139



Teil 3: Neue Entwicklungen

Bleibende Aufgaben und ihre Lösungswege: Toxikologie-Forschung in der EU und den USA

Prof. Dr. med. Horst Spielmann

Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin

Königin Luise Str 2-4, D-14195 Berlin

Es ist aufgrund intensiver Forschungsanstrengungen vor allem in Europa gelungen, im Rahmen der Sicherheitsprüfung von Kosmetika und deren Inhaltsstoffen erforderliche belastende Tierversuche durch modern tierversuchsfreie Prüfmethode zu ersetzen. Dabei hat die Industrie eng mit Universitäten und Behörden kooperiert. Wesentliche Beiträge haben dazu erfolgreiche vom deutschen Forschungsministerium BMBF geförderte Projekte geleistet. Die EU Kommission hat über die DG Research & Innovation und auch über das Joint Research Centre JRC die Entwicklung und Validierung solcher Methoden gefördert.

Nur aufgrund dieser vereinten Anstrengungen ist es in Europa gelungen, die gesetzlichen Vorgaben der 7. Änderung der EU Kosmetikrichtlinie zu erfüllen, nach der Verträglichkeitsprüfungen an Haut, Augen und Schleimhäuten nicht mehr im Tierversuch durchgeführt werden dürfen.

Schwieriger wird es sein, chronische systemische Toxizitätsprüfungen mit wiederholter Gabe an die Versuchstiere durch tierversuchsfreie Methoden zu ersetzen, wie es die 7. Änderung der EU Kosmetikrichtlinie ab 2010 verlangen wird.

Um dieses sehr schwierige Problem zu lösen, hat die „US Academy of Science“ im Jahr 2007 einen neuen wissenschaftlichen Ansatz für die Toxikologie publiziert mit dem Titel „Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy“. Es handelt sich dabei um ein völlig neues Konzept, bei dem mit modernen molekularbiologischen, molekulargenetischen und zellbiologischen Methoden unter Verwendung menschlicher Zellen und Gewebe die Probleme der Langzeit-Toxikologie gelöst werden sollen. Die US Behörden NIH (National Institute of Health), EPA (Environment Protection Agency), FDA (Food and Drug Administration) und das NTP (National Toxicology Program) unterstützen seit 2008 dieses Konzept mit erheblichen Fördermitteln. Weiterhin haben die Wissenschaftler der beteiligten Institutionen und Toxikologen von Universitäten und aus der Industrie ein anspruchsvolles „Human Toxicology Project“ auf den Weg gebracht zu dem auch das Forschungsprojekt „Toxicity Testing in the 21st Century“ (TT21C) gehört.

Als Reaktion auf diese Entwicklung fördert die EU Kommission (DG Research and Innovation) seit 2010 das Projekt AXLR8 (sprich engl. „accelerate“ = beschleunigen), das zum Ziel hat, das „Toxicology in the 21st Century“ Konzept in Europa durch eine Koordinierung der Forschung auf dem Gebiet der Entwicklung von Alternativmethoden zu fördern. Die Freie Universität Berlin ist Koordinator des AXLR8 Projektes und kooperiert dabei mit Wissenschaftlern aus Belgien, England



und den USA. In den Jahren 2010 und 2011 fanden zwei AXLR8 Workshops statt, auf denen Vorschläge zur Forschung auf dem neuen Gebiet der molekularen Toxikologie mit menschliche Zellen und Geweben gemacht wurden. Die Ergebnisse sind u.a. auf der Website www.AXLR8.EU publiziert.

Es werden erste Ergebnisse vorgestellt, die mit den neuen Methoden erzielt wurden.

