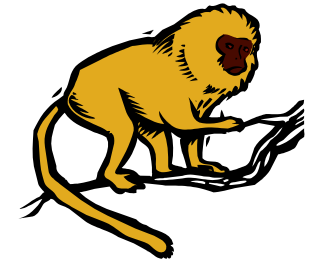
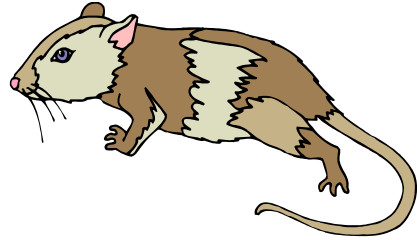


# Sistema di Qualità in Pre-clinica



**Buone Pratiche di Laboratorio (BPL)**

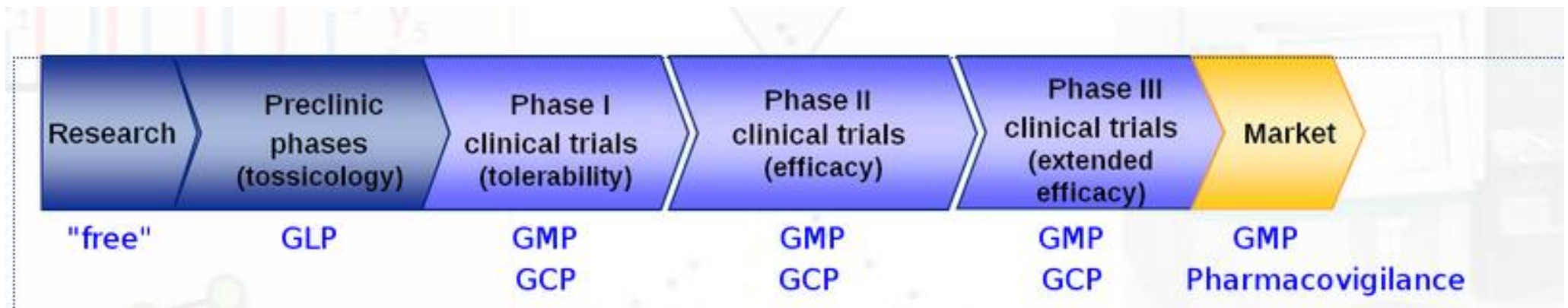
-

**Good Laboratory Practice (GLP)**



# Sistemi di Qualità nello sviluppo di un farmaco

Nel processo di sviluppo dei farmaci devono essere rispettate una serie di norme generalmente conosciute come 'Buone pratiche standard' GxP



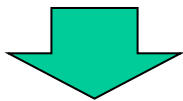
# Cenni storici: nascita FDA/GMP/GLP

## THE POISON SQUAD



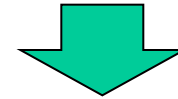
Harvey Wiley and members of the "Poison Squad" (ca.1902)

**Pasti gratuiti, di alta qualità e ...?**



*Effetti osservati: vomito, diarrea, mal di stomaco e inabilità al lavoro*

Assenza di normative per conservanti alimentari aggiunti ai cibi dal 1880 (assenza di etichette)



Studio: «Influence of food preservatives and artificial colors on digestion and health»



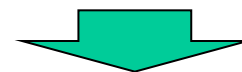
Solfato rameico  
Formaldeide  
Borace



# Cenni storici: nascita FDA/GMP/GLP

FDA moderna

Medicinali brevettati



FRODI

- ❖ False dichiarazioni
- ❖ Mancanza di controllo di qualità
- ❖ Uso di componenti tossici
- ❖ Uso di sostanze che davano dipendenza

Questi **SCANDALI** segnarono il primo passo verso le GMP



- ❖ CORRETTA ETICHETTATURA
- ❖ PROIBITO USO DI TOSSICI

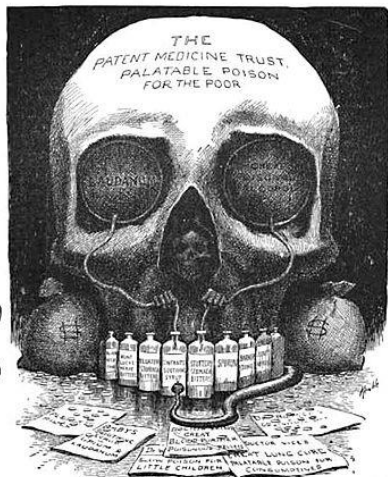


Origine della moderna FDA  
(Food and Drug Administration)

Saturday, 23 December, 1905

PUBLIC OPINION

827



Death's Laboratory.

Drawn by E. W. Kemble

## COLLIER'S EXPOSÉ OF THE PATENT MEDICINE FRAUD

### DEATH'S LABORATORY

"Patent medicines are poisoning people throughout America to-day. Babies who cry are fed laudanum under the name of syrup. Women are led to injure themselves for life by reading in the papers about the meaning of backache. Young men and boys are robbed and contaminated by vicious criminals who lure them to their dens through seductive advertisements."

### CRIMINAL ALLIANCE OF THE NEWSPAPERS WITH FRAUD AND POISON

"Newspapers have done so much to create the success of 'fakes' in medicine that their duty is clearly to help remove them. It sounds high-minded for Journalism to bark ferociously against the reign of graft in politics or in high finance, but it can practice a little *seaf* reform, if it chooses, by canceling some of the most profitable results of its own limberness of conscience."

### THE GREAT AMERICAN FRAUD

"Gullible America will spend this year some seventy-five millions of dollars in the purchase of patent medicines. It will swallow huge quantities of alcohol, an appalling amount of opiate and narcotics, a wide assortment of varied drugs, ranging from powerful and dangerous heart depressants to insidious liver stimulants; and, far in excess of all other ingredients, unfluted fraud."

### PERUNA AND THE "BRACERS"

"So well recognized is the use of Peruna for its alcoholic effects that a number of Southern papers advertise a cure for the 'Peruna habit.' What makes Peruna profitable to the maker and a curse to the community at large, is the fact that the minimum dose first ceases to satisfy; then the moderate dose, and finally the maximum dose; and the unsuspecting patron, who began with it as a medicine, goes on to use it as a beverage, and finally to be enslaved by it as a habit."

### CONSPIRACY AGAINST THE FREEDOM OF THE PRESS

"So it was no mean intellect which devised the scheme whereby every newspaper in America is made an active lobbyist for the Patent Medicine Association. The man who did it is the present president of the organization; its executive head in the work of suppressing public knowledge, stifling public opinion, and warding off public legislation."

### LIQUOZONE

"Liquozone is sulphurous and sulphuric acids (corrosive poisons) heavily diluted; that is all. Will the compound destroy germs in the body? A series of tests conducted by the Lederle Laboratories answers the question in this summary: 'To summarize, we would say that *Liquozone* had no curative effect, but did, when given in pure form, lower the resistance of the animals so that they died a little earlier than those not treated.'

### THE SUBTLE POISONS

"Nostriums there are which reach the thinking classes as well as the readily gullible. Depending as they do for their success upon the lure of some subtle drug concealed under a trade-mark name, or some quipie not readily obtainable under its own label, these are the most dangerous of all quack medicines, not only in their immediate effect, but because they create enslaving appetites, sometimes obscure and difficult of treatment; most often, tragically obvious. Of these concealed drugs, the headache powders are the most widely used."

Other Articles to be Announced Later

If you can not secure these issues from your dealer, they will be mailed to you on receipt of price, which may be sent in the form of stamps. Address P. F. COLLIER & SON, 429 West Thirtieth Street, New York City.

NEWSDEALERS EVERYWHERE

Collier's  
THE NATIONAL WEEKLY

TEN CENTS PER COPY

When writing to advertisers mention "Public Opinion"

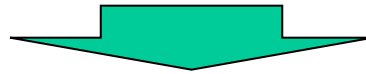


# Cenni storici: nascita FDA/GMP/GLP

Lo scandalo dell'IBT

*Industrial BIO-TEST Laboratories, Inc.*

- Principale laboratorio tossicologico del Nord-America ('60-'70)
- 45% dei test non-clinici (potenziali farmaci, pesticidi, additivi alimentari)
- 1970: installazione di un sistema automatico per alimentare i topi (The swamp!)
- 1976: ispezione da parte della FDA



La più grande frode scientifica di sempre!!

Migliaia di risultati NON VALIDI su  
pesticidi, prodotti farmaceutici e cosmetici

# Riferimenti alla normativa

Necessità di conferire **credibilità, validità e confrontabilità** all' informazione sperimentale ottenuta nell' effettuazione di studi non clinici sulla salute umana e sulla sicurezza ambientale, nonché la necessità di **prevenire** ogni tipo di **azione fraudolenta**.



**GLP**

1. **Formazione del personale**
2. **Definizione delle responsabilità**
3. **CURA degli animali**
- 4.....

**DEFINIZIONE:** Good Laboratory Practices (G.L.P) definisce i principi con cui le ricerche di laboratorio (studi) sono **programmate, condotte, controllate, registrate e riportate**, allo scopo di **ottenere dati sperimentali di elevata qualità**.

# GLP come codice di comportamento

I Principi di Buona Pratica di Laboratorio **non entrano nel merito della scientificità** dei saggi o nel disegno sperimentale degli studi.

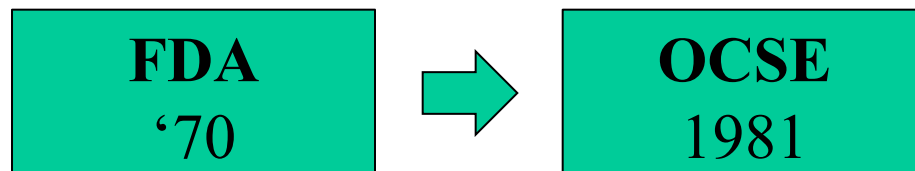
Il protocollo può essere **basato sulle linee guida** e il suo valore scientifico verrà giudicato dal valutatore dell' autorità competente che lo riceverà.

L' obiettivo della BPL è quello di definire piuttosto un **Codice di Comportamento generale** che può essere applicato a qualsiasi tipo di sperimentazione.

# Riferimenti alla normativa

GLP adottate dall' **OECD** (Organisation for Economic Cooperation and Development)

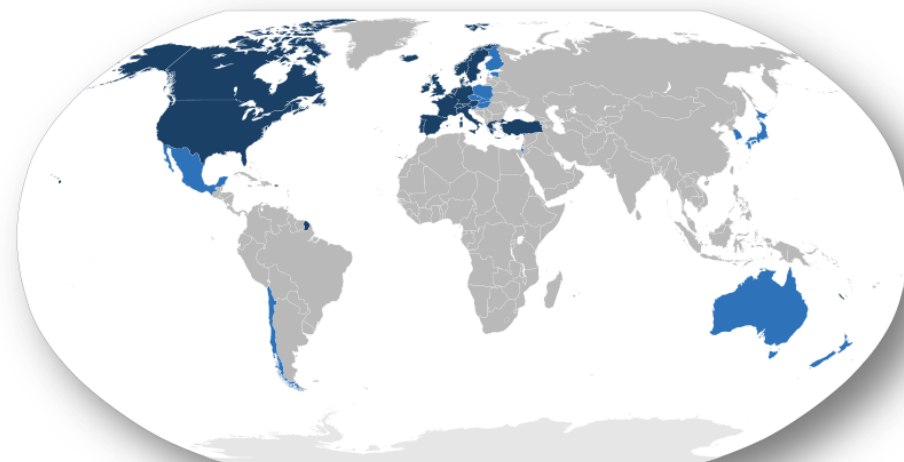
[**OCSE** = **O**rganizzazione per la **C**ooperazione e lo **S**viluppo **E**conomico]



MAD (Mutual Acceptance of Data) tra i Paesi dell'Unione Europea e gli altri Stati **membri dell'OCSE**

Per evitare differenze nei programmi di esecuzione degli studi, che potrebbero **ostacolare il commercio internazionale dei prodotti chimici**, gli Stati membri dell'OCSE hanno voluto **armonizzare** i metodi utilizzati per la sperimentazione e la buona pratica di laboratorio.

A tale sistema possono aderire anche **Paesi non OCSE** valutazione e verifica ispettiva da parte di tre rappresentanti dei Paesi OCSE → l'esito positivo consente al Paese non OCSE di diventare a pieno titolo aderente al MAD



■ Paesi fondatori  
■ Altri Paesi membri



# Sistemi di Qualità nello sviluppo di un farmaco

Gli aspetti più rilevanti delle GxP sono:

**TRACCIABILITA'**, cioè la capacità di ricostruire la storia e la qualità del farmaco durante lo sviluppo

Modalità con cui individuare le **RESPONSABILITA'**, perché sia scritto chi deve fare e cosa in caso di incidenti

Il pieno rispetto di questi standard viene controllato attraverso un sistema **ISPETTIVO** da parte delle autorità regolatorie nazionali competenti



# PREMESSA

Ogni laboratorio impegnato a produrre studi non clinici in conformità ai principi della GLP deve essere **CERTIFICATO** dall' Unità di Monitoraggio (UdM) per la conformità alla GLP della nazione in cui opera. **In Italia l' autorità competente è il Ministero della Salute, Dipartimento di Prevenzione e Comunicazione.**

La Good Laboratory Practice (GLP) o, in Italia, Buona Pratica di Laboratorio (BPL), **rappresenta un insieme di regole che garantiscono la qualità delle prove non cliniche di laboratorio.**

The image shows a screenshot of the Italian Ministry of Health website. At the top left is the logo of the Italian Republic and the text 'Ministero della Salute'. On the top right, there is a search bar with the text 'Cerca nel sito' and a 'cerca' button, along with social media icons for Facebook, Twitter, YouTube, and RSS. The main banner features a large green box with the number '1500' and the text 'Liste di attesa Cosa sapere' and 'lunedì-venerdì, ore 10-16'. Below the banner is a navigation menu with four items: 'La nostra salute', 'Temi e professioni', 'News e media', and 'Ministro e Ministero'. Below the menu, the breadcrumb trail reads 'Sei in: Home > Temi e professioni > Dispositivi medici e altri prodotti > Buona pratica di laboratorio > BPL in Italia'. The main content area has a title 'BPL in Italia' and a sub-header 'I temi di questa sezione sono a cura di: Direzione generale della prevenzione sanitaria'. The web editing credit is 'Web editing: Daniela Sordi'.

Il Ministero (come Autorità nazionale di controllo della BPL) provvede a:

- a) formare e tenere aggiornato **l'elenco generale dei centri di saggio**
- b) formare, tenere aggiornato e **pubblicare l'elenco dei centri che operano secondo i principi di B.P.L.**
- c) curare l'elaborazione e **l'attuazione del Programma nazionale di conformità alla B.P.L.**
- d) curare la predisposizione della lista nazionale degli ispettori di B.P.L.
- e) predisporre la **relazione annuale da inviare alla commissione europea**

# Lista Centri di Saggio in Italia

## Centri di saggio certificati BPL - dati aggiornati al 14/04/2022

Denominazione CdS	Indirizzo	Comune	CAP	PV	Regione	Data Cert.	Num. Cert.	Anno Cert.	Aree di Expertise
Dompé farmaceutici S.p.A.	Via Campo di Pile	L'Aquila	67100	AQ	Abruzzo	24/03/2022	9	2022	1, 9: pharmacokinetics/toxicokinetics and ADME studies
Res Agraria s.r.l.	Via Antonio Canova, 19/2	Tortoreto Lido	64018	TE	Abruzzo	16/03/2022	6	2022	5, 6
BIOFARM SRL	Via Benedetto Cozzolino , snc , c/o Mercato dei Fiori di Ercolano	Ercolano	80056	NA	Campania	26/10/2018	25	2018	6
CdS MIR-Biogem	Via Camporeale, snc	Ariano Irpino	83031	AV	Campania	02/09/2019	21	2019	2, 9: biocompatibility studies, pharmacokinetics/toxicokinetics and ADME studies

# Campo di applicazione delle GLP

Diversamente da GMP e GCP, la **GLP** non si applica solo a studi sui farmaci ma alle prove non cliniche effettuate per *tutti i prodotti* (la cui introduzione sul mercato comporta una notifica o *autorizzazione* da parte di una autorità competente) volte a valutare gli effetti **sull'uomo, sugli animali e sull'ambiente**



# Principali settori di attività GLP

- **Studi di Tossicità**
- **Studi Chimico-fisici**
- **Studi di Mutagenesi**
- Studi di Tossicità ambientale su organismi acquatici sul comportamento in acqua, terra, aria
- Studi sui Residui
- Studi sugli effetti sul Mesocosmo ed Ecosistemi naturali
- **Studi di Chimica clinica e analitica**
- **Studi di Metabolismo e Farmacocinetica**
- Studi di Rimozione virus
- Altro



# Riferimenti alla normativa: quadro riepilogativo

## Internazionale

## Nazionale

1978 Normativa FDA: Non-Clinical Laboratory Studies

1981 Linee-guida OECD per saggi ed ispezioni

1982 OECD: Principi BPL

1986-90 Direttive Europee (88/320 e 90/18) per  
l' applicazione dei principi di BPL

D.Lgs.n° 120 - 27 Gennaio 1992

1997 OECD: revised

1999 Direttive Europee (99/11 e 99/12) sui  
nuovi principi di BPL

D.M. n° 241- 5 Agosto 1999

2004 Direttive Europee (2004/9 e 2004/10)

D.Lgs.n° 50 - 2 Marzo 2007

# Terminologia in uso nella normativa

## Organizzazione generale di un Centro di Saggio

- **Centro di saggio** (Test facility): insieme di persone, locali e unità operative necessarie per l'esecuzione di uno studio non clinico sulla sicurezza per la salute umana e l'ambiente
- **Direzione del Centro di Saggio** (Test facility Management): persona/e cui è attribuita l'autorità e la *responsabilità dell'organizzazione e del funzionamento del CdS*
- **Sito di sperimentazione** (Test site): luogo dove si esegue una o più fasi di uno studio

# Terminologia in uso nella normativa

## Organizzazione generale di un Centro di Saggio

➤ **Committente** (Sponsor): persona che commissiona, finanzia e/o demanda uno studio non clinico

**Direttore dello Studio** (Study Director): persona responsabile dell'esecuzione globale di uno studio non clinico

**Ricercatore Principale** (Principal Investigator): persona che, in uno studio multisito, **agisce a nome del DS** assumendo responsabilità ben definite per talune fasi dello studio.

# Terminologia in uso nella normativa

## Studio non Clinico sulla sicurezza per la salute e l'ambiente

- **Studio non-clinico sulla sicurezza** (Non-clinical safety study): studio
- **Studio a breve termine** (Short-term study): studio di breve durata in cui si utilizzano tecniche routinarie
- **Programma di Studio** (Study Plan): documento in cui sono definiti gli obiettivi ed il disegno sperimentale per l'esecuzione dello studio
- **Sistema di Saggio** (Test system): qualunque sistema biologico, chimico o fisico o qualunque combinazione di tali sistemi utilizzati in uno studio
- **Dati grezzi** (Raw Data): **dati e documenti originali risultato di osservazioni** originali ed attività realizzate nello studio.

# Terminologia in uso nella normativa

## Studio non Clinico sulla sicurezza per la salute e l'ambiente

- **Reperto** (Specimen): qualunque materiale derivato da un sistema di saggio
- **Data inizio sperimentazione** (Experimental starting date): giorno di raccolta dei primi dati specifici di uno studio
- **Data conclusione sperimentazione** (Experimental completion date): ultimo giorno di raccolta di dati relativi allo studio
- **Rapporto Finale** (Final Report)
- **Sostanza di saggio** (Test item): sostanza in esame
- **Sostanza di riferimento** (controllo) (Reference item): sostanza utilizzata a fini di confronto
- **Lotto** (Batch): quantità specifica o partita della sostanza in esame o di riferimento
- **Veicolo** (Vehicle): agente utilizzato come vettore

# I centri di Saggio (CdS)

**Centro che esegue  
studi non-clinici**

**Richiesta certificato**

**Rilascio certificato  
(2 anni)**

Requisiti → possedere 1. risorse e spazi adeguati  
2. Unità di Assicurazione della Qualità

**CdS: personale+locali+strumenti**

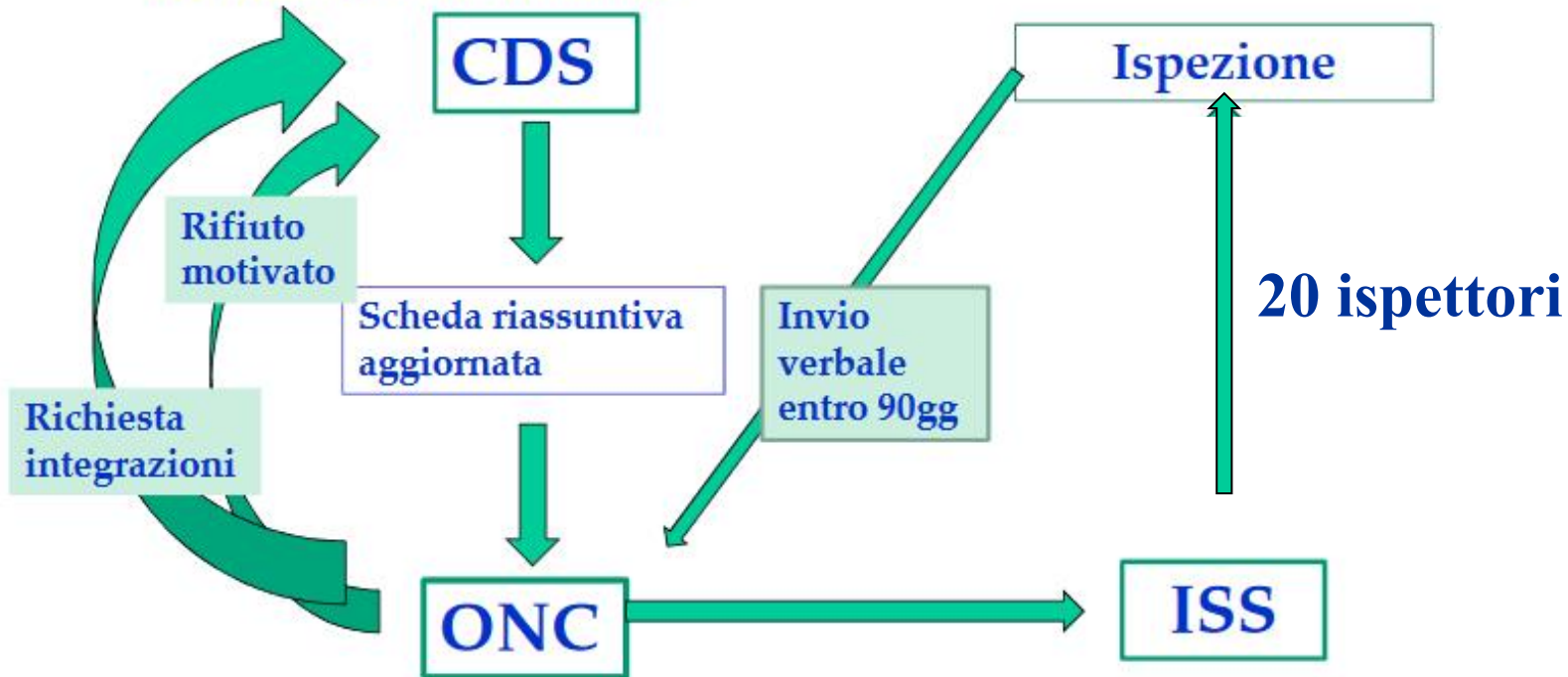
**CENTRI MULTISITO: CdS principale  
+  
singoli siti di sperimentazione**

**Su commissione di un committente (sponsor)**



# Iter per il rilascio della certificazione

Il rilascio della certificazione deve avvenire entro 180 giorni dal ricevimento della domanda



Ai sensi dell'art. 4, comma 1, del decreto legislativo 2 marzo 2007, n. 50, qualora gli accertamenti effettuati diano esito positivo, l'ONC provvede a certificare il CdS (30 gg)

ONC = Organismo nazionale di controllo della GLP

# Certificazione BPL

- La certificazione BPL è un riconoscimento formale, da parte di un' Autorità Istituzionale, della idoneità di un Centro di Saggio ad operare conformemente ai principi di Buona Pratica di Laboratorio per determinate tipologie di studi.
  - La certificazione garantisce la veridicità e la qualità del dato prodotto dal singolo Centro di Saggio in un singolo ed individuato studio e facilita gli accordi bi- o multilaterali di accettazione dei dati
- In Italia la BPL è di competenza del **Ministero della Salute** presso cui è stata istituita l' **Unità di Monitoraggio per la BPL**.
- La certificazione ha una validità **di 2 anni** a partire dalla data di rilascio.

# I centri di Saggio (CdS)

Attività da predisporre e documentare

**Organizzazione  
del CdS e del  
personale**

**Strutture e  
ambienti**

**Documentazione**

**Materiali ed  
attrezzature**

**Gestione dello  
studio**

**Unità di  
assicurazione  
della qualità**

# I centri di Saggio (CdS)

Attività da predisporre e documentare

## ORGANIZZAZIONE

Funzioni Amministrative  
Funzioni Scientifiche  
Responsabilità



## FIGURE COINVOLTE



# Direttore dello Studio



Il programma di studio è il documento nel quale vengono definiti gli obiettivi ed il disegno sperimentale per l'esecuzione dello studio, incluse eventuali modifiche.

*Le BPL impongono di seguire scrupolosamente il programma di studio e la sua precisa documentazione.*

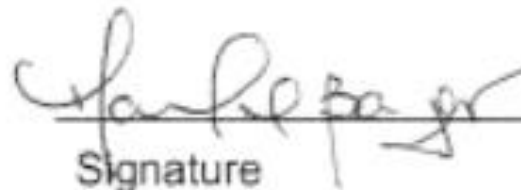
Ogni cambiamento nel programma deve essere annotato e giustificato.

## Compliance with Good Laboratory Practice

This preclinical laboratory study was conducted and reported in compliance with requirements of the Good Laboratory Practice Regulations, Fed. Reg., Vol. 43, 21 CFR Part 58, 22-Dec-1978 and all subsequent Amendments. Toxicokinetic analysis was performed in compliance with the French Decree relating to Good Laboratory Practice (GLP), adopted March 14th, 2000 and published by the French Government Publications on March 23<sup>rd</sup>, 2000; to the European Directive (2004/10/EC) and to the OECD Principles of Good Laboratory Practice (1992), as revised in 1997 and adopted November 26th, 1997 by decision of the OECD Council [C(97) 186/Final].

This report represents a true and accurate record of the results obtained. As study director, I accept the responsibility for the conduct of the study, the validity of the data, and the final report.

M Boyer, DESS Toxicology  
Research Scientist,  
General Toxicology  
Charles River Laboratories

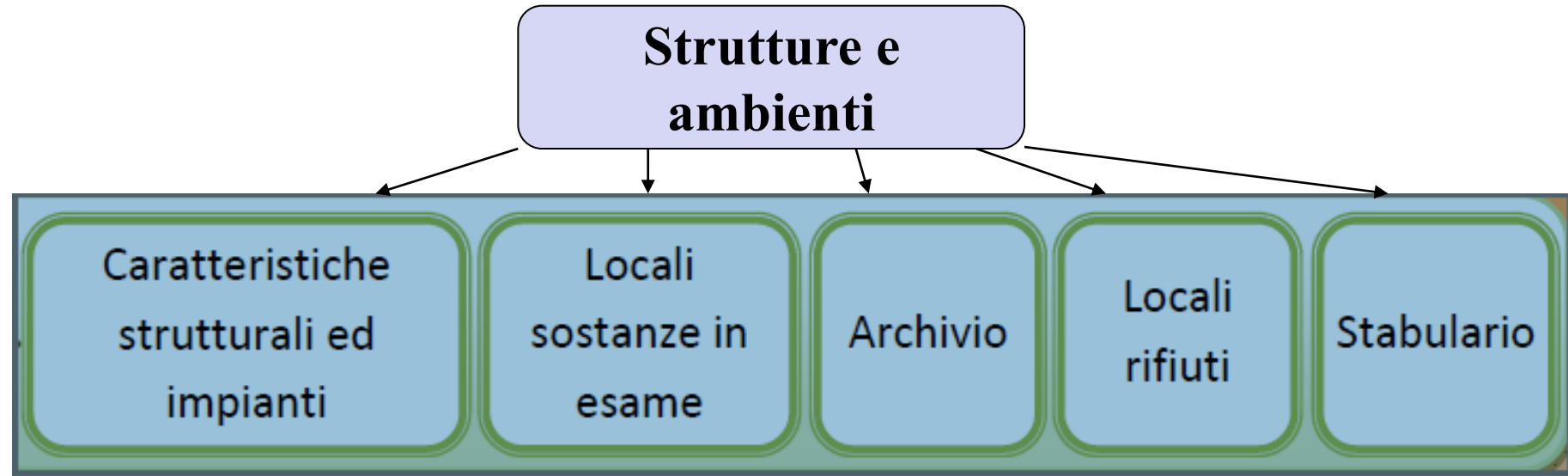
  
Signature

14/03/07  
Date



# I centri di Saggio (CdS)

Attività da predisporre e documentare



- Garantire la sicurezza
- Non influenzare i risultati

- Manipolazione
- Deposito
- Separati dal locale del saggio

- Conservazione documenti
- Conservazione Campioni e reperti
- Facile individuazione

- Mantenimento dei sistemi di saggio (es: animali da esperimento)

# I centri di Saggio (CdS)

Attività da predisporre e documentare

**Documentazione  
di tutte le attività  
del centro**

```
graph TD; A[Documentazione di tutte le attività del centro] --> B[PROSPETTO GENERALE dei lavori (eseguiti ed in corso)]; A --> C[SOP (Procedure Operative Standard)];
```

**PROSPETTO GENERALE**  
dei lavori (eseguiti ed in corso)

**SOP (Procedure Operative Standard)**

Procedure di Lavoro scritte (aspetti tecnici ed amministrativi) e presenti in tutti i laboratori del centro

I principali benefici che derivano dalle SOP sono:

- Controllo della standardizzazione di una serie di variabili sperimentali (es. confrontabilità dei dati, tracciabilità delle operazioni, indipendenza dall'operatore o dalle condizioni ambientali, etc..)
- Addestramento del personale di laboratorio
- Il personale addestrato è intercambiabile
- Memoria storica delle SOP

# SOP richieste dalla BPL

- **Sostanze in esame e di riferimento**  
Flusso (Ricezione, identificazione, etichettatura,...).  
Modalità di preparazione e analisi chimica (titolo, purezza...)
- **Strumentazione, materiali, reagenti:**  
strumentazione (uso, manutenzione, taratura...)  
sistemi informatizzati (convalida, sicurezza, ...)  
materiali e reagenti (preparazione ed etichettatura)
- **Registrazione dati, relazioni, deposito e consultazione**  
Codifica, raccolta dati, stesura relazioni, elaborazione dati (inclusi sistemi informatizzati), sistemi di repertoriazione.
- **Sistemi di saggio (animali)**  
flusso, condizioni ambientali  
preparazione/manipolazione, flusso reperti
- **Assicurazione qualità**  
Programmazione ed esecuzione attività

# I centri di Saggio (CdS)

Attività da predisporre e documentare

## Materiali ed attrezzature

Sistemi di  
saggio

Attrezzature

Sostanze in  
esame e di  
riferimento

Sistemi  
informatici

- Sistemi Chimico-fisici
- Sistemi Biologici

- Uso corretto
- Controlli periodici

- Data produzione
- Scadenza
- Metodo di conservazione

Qualità del fornitore

(assenza contaminazioni, problemi di  
trasposto,..)

# I centri di Saggio (CdS)

Attività da predisporre e documentare

**Unità di  
assicurazione della  
qualità**

*Il Quality Assurance deve assicurare alla Direzione che il Centro di Saggio opera nel rispetto dei principi di BPL.*

Il **Quality Assurance** deve al minimo:

- Conservare copia di tutti i programmi di studio approvati
- Conservare copia di tutte le SOP utilizzate nel CdS
- Verificare e documentare che il programma di studio contenga le informazioni necessarie per la conformità ai principi di BPL
- Effettuare ispezioni per stabilire se tutti gli studi sono condotti in conformità ai principi di BPL

### Quality assurance statement

In compliance with the Good Laboratory Practice Regulations, study no. 802218 has been audited. The data presented in the final report accurately represent the data collected during the conduct of the study. The phases of this study performed by PCS-MTL were inspected by the Quality Assurance Unit and the results of the inspections were reported to the study director and management.

Phase or segment audited	Dates of inspection	Dates of reports to management and study director
Ophthalmology - Process audits	August 18, 2006	August 24, 2006
Study schedule - In-life	August 30, 2006	August 31, 2006
Pharmacy - In-life	August 30, 2006	
Study start up - Provantis - In-life	August 30, 2006	
Protocol/Work plan - In-life	August 30, 2006	
Pk/Tk blood collection - In-life	August 31, 2006	
Dose administration - In-life	August 31, 2006	
Food consumption - Process audits	September 28, 2006	October 3, 2006
Dose administration - In-life	October 6, 2006	October 6, 2006
Pharmacy - In-life	October 11, 2006	October 11, 2006
Study start up - Pathdata - In-life	November 29, 2006	November 30, 2006
Necropsy - In-life	November 30, 2006	
Necropsy - In-life	December 28, 2006	December 29, 2006
Ophthalmology - Report review	February 5, 2007	February 5, 2007

E David, BSc, RQAP-GLP  
Inspector  
Quality Assurance  
Charles River Laboratories

Signature

14-03-07

Date

A Graham, BSc, RQAP-GLP  
Regulatory Manager  
Quality Assurance  
Charles River Laboratories

Signature

Date

14 Mar 2007

# Relazione finale (Report)

- Per ciascuno studio occorre presentare una **relazione finale**.
- In caso di studi a breve termine è sufficiente una relazione finale standard, accompagnata da allegato specifico.
- Le relazioni dei ricercatori principali o di altri ricercatori che partecipano allo studio devono essere firmate e datate dagli autori.
- La relazione finale deve essere firmata e datata dal Direttore dello studio, il quale si assume così la responsabilità della validità dei dati. Deve essere indicato il **livello di conformità** ai principi di BPL.



# ESEMPIO DI STUDIO

## 1. STUDY INFORMATION

### SPONSOR

Laboratoire ECOSYSTEM

Sponsor representative: Frédéric **XXXXXXXXXXXXXX**

### TEST FACILITY

**XXXXXXXXXX** Srl – Sede di PAVIA

Address: Via **XXXXXXXXXXXXXX**

Study Director: Dr. Silvana **XXXXXXX**

Test Facility Manager: Dr. Angela **XXXXXXX**

Quality Assurance Responsible: Dr. Francesco **XXXXXXX**

## 2. STATEMENT OF COMPLIANCE TO GOOD LABORATORY PRACTICE

The undersigned Silvana XXXX as a Study Director of the Test Facility XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX - Sede di PAVIA, declares that the study described in the present Report has been carried out by myself and/or under my direct supervision in compliance with the requirements of Decreto Legislativo n.50 del 2 Marzo 2007 (recepting the Directive 2004/09/CE and 2004/10/CE concerning the inspection and verification of Good Laboratory Practice and harmonization of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances)

The study has been carried out at the Test Facility XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | - Sede di PAVIA, recognized by the Certificate of Compliance with the Principles of Good Laboratory Practice n. 2017/7 dated 20/02/2017.

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 25/08/2017

Study Director  
Dr. Silvana

XXXX

## 3. RQAU STATEMENT

(dichiarazione del responsabile dell'Unità QA

---

## 4. IDENTIFICATION OF THE STUDY, TEST ITEM AND REFERENCE ITEM

### 4.1 TITLE OF STUDY

In vitro evaluation of the ocular irritation potency – Neutral Red Uptake Assay

Living Hair

Batch: LH237

This study has been carried out for regulatory purposes according to Regulation (EC) n° 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (Text with EEA relevance) and to its annexes.

### 4.2 IDENTIFICAZIONE OF THE TEST ITEM

Living Hair

Batch: LH237

Arrived on 14/07/2017

Storage condition RT

Tested product is a shampoo, with the following INCI:

PFAFFIA PANICULATA EXTRACT, AVENA SATIVA, COCOS NUCIFERA OIL, PERSEA GRATISSIMA OIL, ILLITE, SODIUM COCOYL ISETHIONATE, SODIUM COCO SULFATE, HYDROLYZED RICE PROTEIN

### 4.3 IDENTIFICAZIONE OF THE REFERENCE ITEM

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) in culture medium (per il controllo positivo)

## 5. INFORMATION ABOUT SPONSOR AND TEST FACILITY

## 6. EXPERIMENTAL STARTING AND COMPLETION DATE

### 6.1 EXPERIMENTAL STARTING DATE

02/08/2017

### 6.2 EXPERIMENTAL COMPLETION DATE

04/08/2017

## 7. DESCRIPTION OF MATERIALS

<b>Reference items</b>	Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
<b>Test system</b>	BALB/c 3T3 cells
<b>Reagents</b>	NR (Neutral Red) SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) Ethanol Acetic acid Deionized water DMEM high glucose Foetal bovine serum Penicillin-Streptomycin L-glutamine Trypsin-edta solution PBS
<b>Instruments</b>	Personal protective equipment Cell incubator 37°C, 95% RH, 5% CO <sub>2</sub> RH BIOTECH Laminar flow cabin with HEPA filters TUV ASALAIR 1200 Optical microscope OPTIKA Well plates Steril tubes (0.5, 2, 15 e 50 ml) Sierological pipettes (5 e 10 ml) Automatic pipettor HAMILTON Mechanical micropipettes Tweezers Scissors Analytical balance KERN ALJ160-4NM Magnetic mixer GDV Plate reader GDV DV990 BV6
<b>Preparation of test item</b>	The product was tested by dilution (8 concentrations were tested) in culture medium.

## 8. TEST METHOD

### TESTING PROCEDURE

(eseguito in accordo con le linee guida)

#### Positive control

Sodium Dodecyl Sulfate is the most frequently used positive control, with an historical NR50 value of 0.093 mg/ml. The test complies the quality criteria if NR50 value of the positive control is between 0.070 – 0.116 mg/ml (confidence interval of 95%).

#### Negative control

Negative control is represented by the culture medium without tested product and that is subjected to the same treatment of tested product. The use of a negative control in a toxicity test allows to evaluate the possible aspecific effects of reagents and dye.

The absolute Optical density value (OD540 of NR) obtained in the negative control reading shows that the cells seeded in the wells grow exponentially with a normal division time. The test complies the quality criteria if OD540 value of the negative control reading is  $\geq 0.3$ .

### RESULTS PRESENTATION AND CALCULATION

Evaluation of cytotoxicity has been carried out by cell viability determination.

It is assumed that Negative control represents the 100% viability.

For each sample and/or dilution, for the positive control cell viability was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ Cell viability} = 100 \cdot \text{OD540 treated cells} / \text{OD540 negative control}$$

Lower is the % cell viability, higher is the product cytotoxic potential.

## 9. RESULTS

NEGATIVE CONTROL	OD540= 1.288 ± 0.035
POSITIVE CONTROL (SDS)	NR <sub>50</sub> = 0.100 ± 0.0020 mg/ml

Living Hair Batch: LH237	NR50 = 214.97 ug/ml MMAS = 34.50
-----------------------------	-------------------------------------

## 10. CONCLUSIONS

According to obtained results, the product

**Living Hair  
Batch: LH237**

is **MODERATE IRRITANT**