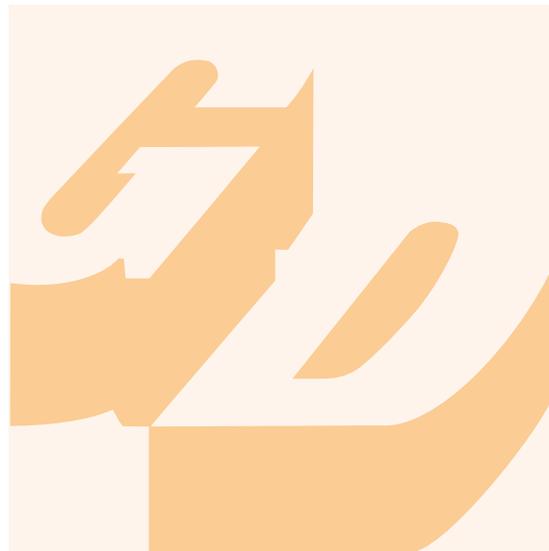


# Abstracts

## Symposium

*„EU Kosmetikverordnung: Welche Folgen hat ein Vermarktungsverbot ab 2013 für Inhaltsstoffe, die im Tierversuch getestet wurden?“*



Gesellschaft für  
Dermopharmazie

Teil 1: Konsequenzen eines Vermarktungsverbotes aus verschiedener Sicht

# Konsequenzen eines Vermarktungs- verbotes aus der Sicht von COLIPA

*Dr. Horst Wenck*

*Beiersdorf AG*

*Unnastr. 48, D-20245 Hamburg*

Die europäische Kosmetikindustrie stellt mit einem Jahresumsatz von ca. 67 Mrd. EUR und insgesamt 177000 direkt beschäftigten einen wesentlichen Wirtschaftsfaktor dar. Sie beschäftigt ca. 17000 Wissenschaftler und bewahrt so ihre führende innovative Stellung in der Welt. Der europäische Kosmetikverband Colipa koordiniert seit der Gründung von SCAAT im Jahre 1992 die Anstrengungen der Industrie zur Entwicklung von Alternativverfahren zur klassischen tierexperimentellen Toxikologie. Die dabei erzielten Fortschritte ermöglichten der Industrie, ihre Innovationsfähigkeit nach der ersten Stufe der Test- und Vermarktungsverbote der EU-Kosmetikrichtlinie im Jahre 2009 zu erhalten. Die vom Vermarktungsverbot im Jahre 2013 betroffenen toxikologischen Endpunkte sind wesentlich komplexer. Alternativen werden in einem umfassenden Programm u.a. auch gemeinsam mit der EU-Kommission erforscht, werden aber nicht rechtzeitig entwickelt und validiert sein. Daher unterstützt die kosmetische Industrie die politischen Institutionen der EU bei der aktuellen Analyse der Auswirkungen der Vermarktungsverbote auf Gesellschaft, Wirtschaft, Beschäftigung und Innovationsfähigkeit. Ausweislich des von der unabhängigen Beratungsgesellschaft RPA erstellten Gutachtens könnten diese Auswirkungen beträchtlich sein und zu substantiellen Nachteilen für den Standort Europa infolge von Schwerpunktverschiebungen in Regionen außerhalb der EU führen.



Teil 1: Konsequenzen eines Vermarktungsverbotes aus verschiedener Sicht

# Konsequenzen eines Vermarktungsverbotes aus juristischer Sicht

*Dr. Andreas Reinhart*

*Sozietät Meyer//Meisterernst*

*Sophienstr. 5, D-80333 München*

Bereits in der EG-Kosmetik-Richtlinie 76/768/EWG ist in Artikel 4a – seit der Richtlinie 2003/15/EG (in Kraft getreten am 11. März 2003) – geregelt, dass Tierversuche mit kosmetischen Mitteln und deren Bestandteile oder Kombinationen von Bestandteilen abgeschafft werden (Testverbot). Daneben verbietet die Richtlinie schrittweise auch das Inverkehrbringen kosmetischer Mittel, die entweder als Fertigerzeugnisse oder als deren Bestandteile oder Kombinationen von Bestandteilen an Tieren getestet worden sind (Vermarktungsverbot).

Das **Testverbot** für kosmetische Fertigerzeugnisse, also das kosmetische Mittel in seiner endgültigen Zusammensetzung, in der es in Verkehr gebracht und dem Endverbraucher zugänglich gemacht wird (Art. 4a Abs. 1 lit. c), findet seit **11. September 2004** Anwendung. Das Testverbot für Bestandteile oder Kombinationen von Bestandteilen (Art. 4a Abs. 1 lit. d) ist zunächst schrittweise zur Anwendung gekommen, sobald Alternativmethoden validiert und rechtlich anerkannt worden sind. Das Testverbot für Bestandteile oder Kombinationen von Bestandteilen greift jedoch – ungeachtet der Verfügbarkeit von Alternativmethoden – spätestens 6 Jahre nach dem Inkrafttreten der Richtlinie 2003/15/EG, d.h. seit dem **11. März 2009**. Das Testverbot ist damit bereits seit knapp drei Jahren umfassend wirksam und gilt **unabhängig davon, ob Alternativmethoden verfügbar sind**.

Das **Vermarktungsverbot** (Art. 4a Abs. 1 lit. a + b) gilt für alle Versuche im Zusammenhang mit der menschlichen Gesundheit und ist zunächst ebenfalls nur schrittweise zur Anwendung gekommen, sobald Alternativmethoden auf Gemeinschaftsebene unter gebührender Berücksichtigung des Validierungsprozesses innerhalb der OECD angenommen wurden. Auch das Vermarktungsverbot findet jedoch spätestens 6 Jahre ab dem Inkrafttreten der Änderungs-Richtlinie 2003/15/EG, d.h. seit dem **11. März 2009**, ungeachtet der Verfügbarkeit von Alternativmethoden Anwendung.

Ausgenommen sind insoweit lediglich Versuche betreffend die **Toxizität bei wiederholter Verabreichung, Reproduktionstoxizität und Toxikokinetik**, für die noch keine Alternativen vorliegen. Im Zusammenhang mit diesen speziellen Tests kommt das Vermarktungsverbot schrittweise zur Anwendung, sobald Alternativmethoden unter gebührender Berücksichtigung des OECD-Validierungsprozesses bestätigt und im EU-Recht angenommen wurden. Hierfür ist jedoch eine Frist von höchstens 10 Jahren ab dem Inkrafttreten der Richtlinie 2003/15/EG, d.h. ab dem **11. März 2013**, vorgesehen, ungeachtet der Verfügbarkeit von Alternativmethoden. Bis dahin gilt: Sind noch keine alternativen Testmethoden verfügbar, können Ergebnisse von Tierversuchen, die vor dem 11. März 2009 durchgeführt wurden, verwendet werden, um die Unbedenklichkeit des auf den Gemeinschaftsmarkt gebrachten Kosmetikproduktes zu belegen (vgl. EU-Kommission, [http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/faq/index\\_de.htm](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/faq/index_de.htm)).



In die neue EU-Kosmetik-Verordnung (VO (EG) Nr. 1223/2009) wurden die geltenden Bestimmungen über das Verbot und das Auslaufen von Tierversuchen für kosmetische Mittel bis zum 11. März 2013 ohne inhaltliche Änderungen übernommen. Der Art. 18 VO (EG) 1223/2009 widmet sich ausschließlich den Tierversuchen und regelt die oben dargestellten Verbote ab dem 11. Juli 2013.

Angesichts der wissenschaftlich eindeutigen Fakten und Prognosen bzgl. der Umsetzbarkeit der ehrgeizigen Ziele wird es jedoch voraussichtlich schwer sein, die Frist 11. März 2013 zu erfüllen. Es gibt zwar heute bereits eine stattliche Anzahl validierter Testmethoden zur Haut- und Augenreizung. Darüber hinaus gibt es auch eine Reihe erfolgversprechender Alternativmethoden zur Prüfung auf allergisierende Wirkung. Es wird damit zunehmend möglich sein, die Sicherheit der in kosmetischen Mitteln verwendeten Bestandteile durch die Verwendung der vom Europäischen Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (EZVAM) auf Gemeinschaftsebene validierten oder als wissenschaftlich validiert anerkannten tierversuchsfreien Alternativmethoden zu gewährleisten. Jedoch gibt es andere Testbereiche, für welche bis zum Stichtag 11. März 2013 ein vollständiger Ersatz von Tierversuchen noch nicht absehbar ist.

Während im Bereich des Chemikalienrechts (REACH) die Tierversuche gesetzlich vorgeschrieben sind, ist im Kosmetikrecht geregelt, dass Tierversuche zum Zwecke der Erfüllung der Anforderungen des Kosmetikrechts gemäß Art. 18 VO (EG) 1223/2009 verboten sind bzw. werden.

Die sich hieraus ergebenden **Konsequenzen** stellen sich wie folgt dar:

- Das Vermarktungsverbot betrifft nur jene Fälle, in denen **Tierversuche zur Einhaltung der Bestimmungen des Kosmetikrechts durchgeführt** wurden. Wird die Sicherheit von Rohstoffen gemäß dem Chemikalienrecht im Tierversuch überprüft, ist der Anwendungsbereich des Kosmetikrechts nicht eröffnet und ein Verstoß gegen das Vermarktungsverbot scheidet aus. Hierbei gilt es aber zu berücksichtigen, dass der Stoffsicherheitsbericht nach REACH Risiken für die menschliche Gesundheit nicht zu berücksichtigen braucht, die sich aus Endverwendungen in kosmetischen Mitteln im Anwendungsbereich des Kosmetikrechts ergeben (Art. 14 Abs. 5 lit. b REACH). Dies bedeutet, dass im Hinblick auf die Endverwendung in kosmetischen Mitteln eine Sicherheitsbewertung von Rohstoffen nach Kosmetikrecht – und damit unter Beachtung der Test- und Vermarktungsverbote – zu erfolgen hat.
- Der Umsetzungszeitraum für das Vermarktungsverbot endete grundsätzlich bereits am 11. März 2009. Für die toxikologischen Endpunkte **Toxizität bei wiederholter Verabreichung, Reproduktionstoxizität und Toxikokinetik** gilt aber zunächst noch eine Ausnahme. Sind noch keine alternativen Testmethoden verfügbar, können Ergebnisse von Tierversuchen, die vor dem 11. März 2009 durchgeführt wurden, verwendet werden, um die Unbedenklichkeit des auf den Gemeinschaftsmarkt gebrachten Kosmetikproduktes zu belegen. Endgültiger Stichtag für die Einführung des Verbots ist jedoch der **11. März 2013** und zwar – gegenwärtig noch – unabhängig von der Verfügbarkeit alternativer Methoden.
- Falls Alternativmethoden für die Endpunkte vor Ablauf der Frist 2013 **aus technischen Gründen** nicht entwickelt und validiert werden können, ist von der Europäischen Kommission dem Rat und dem Europäischen Parlament im **Jahresbericht 2011** über die Entwicklung,



Validierung und rechtliche Anerkennung von Alternativmethoden zu Tierversuchen im Bereich kosmetischer Mittel darüber zu berichten und ein **Legislativvorschlag** vorzulegen (vgl. Art. 18 Abs. 2 UAbs. 5 VO (EG) 1223/2009).

- Bericht der Kommission vom 13.09.2011: Für **5 der 7** für die Sicherheit kosmetischer Mittel maßgeblichen Endpunkte mit **Einstellungsfrist 2009** stehen derzeit Alternativmethoden zur Verfügung. Die Methoden zur Prüfung von Mutagenizität/Gentoxizität werden derzeit verbessert. Bei den verbleibenden beiden Endpunkten „Augenreizung“ und „akute Toxizität“ sind Fortschritte zu verzeichnen.
- Bericht der Kommission vom 13.09.2011: Für die Prüfung der 3 toxikologischen Endpunkte, die unter die **Einstellungsfrist 2013** fallen, werden vor Inkrafttreten des Verbots des Inverkehrbringens **keine validierten Alternativmethoden** zur Verfügung stehen. Dank intensiver Anstrengungen konnten aber mehrere Methoden entwickelt werden, mit denen sich Tierversuche teilweise ersetzen lassen. Ein **vollständiger** Ersatz der Tierversuche ist zum jetzigen Zeitpunkt aber noch **nicht** möglich.
- Nach dem Bericht wird es damit **nicht möglich** sein, **bis zum vorgesehen Termin 2013 Alternativmethoden für Tests der komplexen Endpunkte** zu finden. Der Bericht beruht auf den Schlussfolgerungen der Experten, die mit der Bewertung der Verfügbarkeit von Alternativmethoden heute und in Zukunft betraut waren. Obwohl Tierversuche bislang nicht vollständig ersetzt werden können, besteht die Möglichkeit einer **teilweisen** Ersetzung und der Entwicklung eines „**Werkzeugkastens**“ mit Testverfahren, der solange verbessert werden kann, bis das Ziel einer vollständigen Ersetzung erreicht ist. Der Mangel an hundertprozentigen Alternativmethoden wird die Kommission **nicht unbedingt** dazu veranlassen, eine **Fristverlängerung** vorzuschlagen.
- Die Europäische Kommission **untersucht gegenwärtig die Auswirkungen der Durchsetzung eines vollständigen Vermarktungsverbots bis 2013** auch ohne Alternativmethoden (Auswirkungen auf Umwelt, Tierschutz, Wirtschaft und Gesellschaft). Auf der Grundlage dieser Bewertung wird sie dann entscheiden, ob sie einen Aufschub des Vermarktungsverbots vorschlägt oder nicht. Die Kommission wird ihre **endgültige Entscheidung bis Ende 2011** bekanntgeben.
- Unter **außergewöhnlichen** Umständen, bei denen bezüglich der Sicherheit eines **bestehenden** Kosmetikbestandteils ernsthafte Bedenken bestehen, kann ein Mitgliedstaat die Kommission ersuchen, eine Ausnahme von dem Verbot zu gewähren (vgl. Art. 18 Abs. 2 UAbs. 6 VO (EG) 1223/2009). Die Kommission kann nach Anhörung des SCCS in Form einer begründeten Entscheidung eine Ausnahme genehmigen. Eine Ausnahme wird aber nur gewährt, wenn
  - der Bestandteil weit verbreitet ist und nicht durch einen anderen Bestandteil mit ähnlicher Funktion substituiert werden kann;
  - das spezifische Gesundheitsproblem für den Menschen begründet und die Notwendigkeit der Durchführung von Tierversuchen anhand eines detaillierten Forschungsprotokolls, das als Grundlage für die Bewertung vorgeschlagen wurde, nachgewiesen wird.

Diese Ausnahme scheidet jedenfalls für neue Stoffe (Forschung) aus.



Teil 1: Konsequenzen eines Vermarktungsverbotes aus verschiedener Sicht

# Safety Assessment of Cosmetic Ingredients and Toxicological Testing without or with the minimal use of Animals

Robert Landsiedel (1), Tzutzuy Ramirez (1), Susanne Kolle (1), Stefan Schulte (2) and Bennard van Ravenzwaay (1)

(1) BASF SE, Experimental Toxicology and Ecology, 67056 Ludwigshafen, Germany

(2) BASF SE, Regulatory Toxicology, 67056 Ludwigshafen, Germany

The use of alternatives to animal studies in toxicology is an ethical imperative and is hence strongly recommended by current EU regulations (i.a. REACH), animal testing is avoided whenever possible. With the new EC Cosmetics Directive animal testing of cosmetic ingredients is completely prohibited for acute toxic effects from 2009 and for repeated dose toxicity from 2013 onwards.

These requirements present a great challenge to the chemical and cosmetics industry, since the safety of cosmetic ingredients is of paramount importance and must be ensured. This could be achieved by using intelligent testing strategies and in vitro methods – provided appropriate methods are available.

For several toxic effects in vitro methods have been established and accepted for regulatory use: skin- and eye irritation as well as skin absorption. These methods are used in routine testing of cosmetic ingredients. Among them, the dermal penetration study using human skin preparations (OECD TG 428) has been a valuable tool in generating data for internal exposure and risk assessments. For other – usually more complex – effects, there is still a need for appropriate in vitro methods and testing strategies: skin sensitization, inhalation toxicity, systemic/organ toxicity after repeated exposure, carcinogenicity and reproductive toxicity. Herein, we propose a concern-driven strategy without or with the minimal use of animal testing for that reason. This strategy is based in the following pillars: 1) Definition of the potential concerns for the use of the cosmetic ingredient, 2) Address potential concerns, 3) Consider the completeness and validity of these data to assess the identified concerns and 4) Choose a risk assessment approach accommodating all of the abovementioned information.

Even though, many efforts have been done to develop strategies to assure the safety of cosmetic ingredients, there is still a great demand for appropriate in vitro methods and also some lack of understanding toxic mechanisms in vivo. Since the safety of cosmetic ingredients is the paramount goal, risk assessment of cosmetic ingredients shall foster the development and validation of new in vitro methods as well as testing and assessment strategies to allow the development and safe use of new cosmetic ingredients in the future.



## Teil 1: Konsequenzen eines Vermarktungsverbot aus verschiedener Sicht

# Konsequenzen aus der Sicht einer forschenden, internationalen Kosmetikfirma

*Dr. Dirk Petersohn*

*Henkel AG & Co. KGaA*

*Henkelstr. 67, D-40191 Düsseldorf*

Als global agierendes Unternehmen ist Henkel, wie andere Unternehmen auch, mit unterschiedlichen regulatorischen Anforderungen in verschiedenen Ländern konfrontiert. Dabei werden für die Sicherheitsbewertung neuer Inhaltsstoffe, global betrachtet, mehrheitlich Tierversuche gefordert. Lediglich die Kosmetikverordnung in Europa fordert und fördert explizit den Einsatz von Alternativmethoden zu Tierexperimenten und regelt in der 7. Änderungsrichtlinie im Detail das Verbot von Tierexperimenten sowie ein Vermarktungsverbot ab dem Jahr 2013. Aus diesem Verbot ergibt sich die Forderung nach umfassenden und zuverlässigen Sicherheitsbewertungen neuer Kosmetikrohstoffe mittels behördlich anerkannter Alternativmethoden. Die derzeitige Verfügbarkeit solcher Alternativmethoden deckt allerdings die Basisanforderungen einer Sicherheitsbewertung für kosmetische Rohstoffe nur zum Teil ab und Henkel unternimmt, gemeinsam mit anderen Unternehmen, erhebliche Anstrengungen, um diese methodischen Lücken zu schließen.

Neben der Entwicklung und Bewertung von Alternativmethoden in den Forschungslaboren, gehören deren Verbreitung und Implementierung in Bewertungsstrategien sowie die Förderung der regulatorischen Akzeptanz, zur Strategie von Henkel.

Trotz der bislang erreichten Erfolge der teilweise wissenschaftlich sehr komplexen Fragestellungen, zeichnet es sich bereits heute ab, dass bis zum Stichtag im Jahr 2013 nicht alle erforderlichen Alternativmethoden entwickelt sein werden, geschweige denn, dass eine behördliche Anerkennung durch die OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) vorliegt, um alle sicherheitsrelevanten Effekte zu bewerten. Auch wenn valide Methoden, deren behördlichen Anerkennungen noch ausstehen, in einem „Weight of Evidence“-Ansatz für Sicherheitsbewertungen mit herangezogen werden können, sind für einige toxikologische Endpunkte keine wissenschaftlichen oder technischen Lösungen vorhanden oder absehbar.

Dies wird zur Folge haben, dass chemisch neue kosmetische Rohstoffe in Europa nicht sicherheitsbewertet werden können und kosmetische Innovationen ausbleiben werden. Daher ist zu erwarten, dass innovative Kosmetikrohstoffe außerhalb von Europa, z.B. in China oder den USA, entwickelt und vermarktet werden und somit nicht unerhebliche Nachteile für den europäischen Kosmetikmarkt entstehen.



Teil 1: Konsequenzen eines Vermarktungsverbotes aus verschiedener Sicht

# Konsequenzen aus der Sicht eines Sicherheitsbewerterers für mittelständische Kosmetikunternehmen

*Dr. Lutz-Michael Lautenbacher*

*Sachverständigenbüro Dr. Lautenbacher GmbH*

*Bahnhofstr. 92, D-82166 Gräfelfing*

Die EU Kosmetik Verordnung EG 1223/2009 die ab dem Juli 2013 u.a. für die Erstellung von Sicherheitsbewertungen einschlägig ist, verbietet auch in Artikel 18 den Einsatz von Stoffen, die im Tierversuch getestet wurden.

In der Sicherheitsbewertung jedoch muss die gesundheitliche Unbedenklichkeit aller in Kosmetika eingesetzten Rohstoffe weiterhin zweifelsfrei belegt werden. Dabei ist der Sicherheitsbewerter in der Pflicht nicht nur die vorhandenen toxikologischen Daten zu bewerten und zu gewichten, sondern natürlich auch die Validität der dazu verwendeten Methoden zu prüfen. Sofern es also Alternativmethoden zur Testung dieser Stoffe gibt, muss unbedingt auch die Validität dieser Methoden ausreichend belegt sein, um zu einem vergleichbaren Ergebnis in der Bewertung zu kommen.

Da gerade mittelständische Unternehmen oft in Lohn produzieren lassen oder aber nur kleinere Mengen an Rohstoffen einkaufen, sind diese auf ausreichende und allgemein zugängliche toxikologische Daten angewiesen. Eine eigene Forschung oder eine Mitarbeit in den interessierten Kreisen der großen Kosmetik- und oder Rohstoffhersteller ist für diese Firmen oft finanziell nicht darstellbar.

Auch die Herausgabe von toxikologischen Daten/Methoden inkl. Validierungsdaten von großen Rohstoffherstellern gestaltet sich aufgrund der geringen Abnahmemengen oft schwierig.

Daher wird dringend an alle beteiligten Kreise appelliert möglichst zügig valide Alternativmethoden zu etablieren und die damit ermittelten toxikologischen Daten zu veröffentlichen. Angeregt wird dabei auch über die Verbände ein entsprechendes Register/Liste von validen toxikologischen Daten zu erstellen.



Teil 2: Sicherheitstoxikologische Prüfungen ohne Tierversuche

# Alternativmethoden für die toxikologische Prüfung von Kosmetika 2013: Position von EFfCI-Experten

*Dorothea Eigler*

*Evonik Industries AG*

*Goldschmidtstr. 100, D-45127 Essen*

Article 4a of the 7th amendment to the Cosmetics Directive (76/768/EEC) requires the establishment of timetables for the implementation of the marketing and testing bans including deadlines for the phasing-out of animal testing. The 2013 marketing ban concerns the endpoints repeated dose toxicity, skin sensitization, carcinogenicity, toxicokinetics and reproductive toxicity. Stakeholders including experts from EFfCI were invited by the European Commission to estimate the time required to have scientifically sound alternative approaches to fully replace animal based test for the a.m. endpoints. The time frames did not include formal validation & acceptance procedures, a multi-year process. The outcome, which has been endorsed by others worldwide, reveals that the scientific basis to fully replace animal testing by 2013 is still not fully established.

Since reasons for testing in the chemical industry are occupational safety, C&L as well as transport regulations and/or REACH etc. driven, EFfCI member companies still have the need to conduct tests for the a.m. 2013 endpoints as they are prescribed by regulatory authorities and not conducted for cosmetic purposes.

Applying the most stringent assumption, that no data generated in animal based methods will be allowed to be used for safety assessments of cosmetic ingredients, regardless of the reason/ location, the European market will be at a great economic disadvantage.

Therefore, EFfCI supports the setting of deadlines based on scientific evidence on the availability and likely future availability of alternatives.

Existing validated in vitro methods are being used as part of an integrated testing strategy as long as their sensitivity and selectivity are ensured.

EFfCI is involved in CEFIC-LRI activities and in ECVAM's (Non-Regulatory) Stakeholder Forum (ESTAF) to give input on upcoming test methods relevance and to comment on prioritisation, applicability domain and technical feasibility.



Teil 2: Sicherheitstoxikologische Prüfungen ohne Tierversuche

## Vermarktungsverbot 2013: Position der Europäischen Tierschutzverbände

*Roman Kolar*

*Akademie für Tierschutz, Deutscher Tierschutzbundes e.V.*

*Spechtstr. 1, D-85579 Neubiberg*

Aufgrund des Drucks der europäischen Tierschutzorganisationen und der Öffentlichkeit wurde bereits 1993 auf europäischer Ebene ein Verkaufsverbot von Kosmetika, deren Inhaltsstoffe in Tierversuchen getestet wurden, innerhalb der Kosmetikrichtlinie verankert. Durch die klare politische Entscheidung, Tierversuche für den Bereich Kosmetik abzuschaffen, wurden in den darauffolgenden Jahren die Anstrengungen zur Entwicklung und Validierung von tierversuchsfreien Testmethoden intensiviert, so dass mittlerweile für einige Bereiche der Sicherheitsprüfung Tierversuche ersetzt werden konnten. Die Tierversuchszahlen für die Prüfung von Kosmetika sanken in der EU drastisch. Doch 18 Jahre nach der ersten gesetzlichen Verankerung des Vermarktungsverbotes wird nun dessen letzte Stufe, die ab 2013 in Kraft treten soll, in Frage gestellt. Experten, die im Auftrag der EU-Kommission den Sachstand hinsichtlich Verfügbarkeit und Entwicklung von tierversuchsfreien Testmethoden dokumentierten, kamen zu dem Schluss, dass es noch Jahrzehnte dauern werde, bis alle Tierversuche zur Chemikalienprüfung ersetzt werden könnten. Auf dieser Grundlage könnte die EU-Kommission einen Aufschub des Termins für das Inkrafttreten erwirken.

Aus der Sicht des Tierschutzes ist ein weiterer Aufschub allerdings nicht zu rechtfertigen. Zahlreiche hochwertige tierversuchsfreie Prüfmethoden stehen zur Verfügung. Mit diesen ließe sich eine Teststrategie speziell für kosmetische Inhaltsstoffe unter Berücksichtigung der Verwendung am Menschen entwickeln. Weder würde der Verbraucher durch das Vermarktungsverbot gefährdet noch die Industrie gehindert weiterhin innovative Produkte herzustellen. Die Einhaltung des Vermarktungsverbotes hat zudem eine wichtige Signalwirkung bezüglich der Glaubwürdigkeit von politischen Entscheidungen auf EU-Ebene. Das Vermarktungsverbot für Kosmetika muss daher unabhängig von der Verfügbarkeit von tierversuchsfreien Alternativen im März 2013 in Kraft treten.



## Teil 2: Sicherheitstoxikologische Prüfungen ohne Tierversuche

# Das Globally Harmonized System (GSH) für die Einstufung und Kennzeichnung von hautreizenden und -ätzenden Stoffen und Produkten mit menschlichen Epidermismodellen

*Dr. Manfred Liebsch*

*Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)*

*Fachgruppe Alternativmethoden zu Tierversuchen – ZEBET,*

*Thielallee 88-92, 14195 Berlin*

In den letzten 10 Jahren wurden in Europa mit finanzieller Unterstützung der Europäischen Kommission rekonstruierte menschliche Epidermismodelle zunächst für die korrekte Vorhersage von ätzenden Eigenschaften und später von hautreizenden Eigenschaften validiert. In beiden Fällen wurde jeweils nach erfolgreichem Abschluss der Validierung und unabhängiger Begutachtung durch ein Peer Review Panel des Europäischen Zentrums zur Validierung von Alternativmethoden (ECVAM) eine weltweite Anerkennung auf OECD Ebene herbeigeführt. Für die Vorhersage ätzender Eigenschaften mit menschlichen Epidermismodellen liegt die OECD Prüfrichtlinie 431 seit 2004 vor, für die Vorhersage hautreizender Eigenschaften die OECD Prüfrichtlinie 439 seit 2010, so dass es durch die beiden Hautmodelltests prinzipiell möglich ist auf den herkömmlichen Standardtest am Kaninchen nach OECD Prüfrichtlinie 404 ganz zu verzichten.

Beide Hautmodelltests wurden entwickelt und validiert, um die in der EU verwendeten Klassifizierungssysteme für gefährliche Stoffe (DSD) und gefährliche Zubereitungen (DPD) zu bedienen. Nach Abschluss der zweiten EU Validierungsstudie (Hautreizung) führte die EU jedoch gleichzeitig mit der neuen Chemikaliengesetzgebung REACH im Januar 2009 das auf UN Ebene global harmonisierte Klassifikationssystem GHS mit der CLP-Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen ein. Die CLP Verordnung ersetzt damit gleichzeitig die DPD, Dangerous Substances Directive 67/548/EWG und die DSD, Dangerous Products Directive 1999/45/EG.

Mit der Einführung der GHS Klassifikationskriterien haben sich, quasi über Nacht, die Leistungen der beiden Hautmodelltests verändert und mussten neu bewertet werden. Dies wurde bei der Konsolidierung des neuen Hautreiztests auf OECD Ebene (OECD TG 439) bereits in einem über 200 Seiten umfassenden Review Dokument vorgenommen und steht für den Test auf ätzende Eigenschaften (OECD TG 431) noch aus. Weiterhin stellte sich heraus, dass der Hautreiztest zwar auf Stoffe und einfache Stoffgemische uneingeschränkt anwendbar ist, dass aber komplizierte Formulierungen wie Pflanzenschutzmittel nicht ohne weiteres mit zufriedenstellenden Ergebnissen geprüft werden können.



Um die den Einsatzbereich und die strategische Verknüpfung der beiden in vitro OECD Tests für das GHS herauszuarbeiten und die wenigen Fälle, in denen derzeit noch der in vivo Test benötigt wird, sauber zu definieren entwickelt die OECD derzeit unter Federführung Deutschlands einen Leitfaden (Guidance Document). Der Vortrag berichtet über den Stand dieser Arbeit.



## 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-Strahlung 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](http://www.AXLR8.EU) publiziert.

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

