

GUTACHTEN ZUR VERGLEICHENDEN GESUNDHEITLICHEN BEWERTUNG VON EPOXIDHARZZYSTEMEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER SENSIBILISIERENDEN WIRKSTÄRKE (FP-0384)

erstellt im Auftrag von:

Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV)

Alte Heerstraße 111 • 53757 Sankt Augustin

FoBiG

Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH

Klarastraße 63 • 79106 Freiburg



Informationsverbund Dermatologischer Kliniken (IVDK)

Institut an der Universität Göttingen

von-Bar-Str.2-4 • 37075 Göttingen

Bearbeitung:

Dr. Karin Heine, Dr. Fritz Kalberlah, Dr. Martin Hassauer (FoBiG)

Prof. Dr. Johannes Geier, Dr. Holger Lessmann (IVDK)

Freiburg, Dezember 2016

ÜBERSICHT

Das Forschungsprojekt beinhaltet die vergleichende gesundheitliche Bewertung von Inhaltsstoffen in Epoxidharzsystemen und eine aggregierte Bewertung von Epoxidharzgemischen mit Fokus auf deren (haut-)sensibilisierende Wirkstärke. 66 Einzelstoffe wurden in einem eigens entwickelten Rankingverfahren Wirkstärkekategorien zugeordnet. Basis für diese Zuordnung war eine umfassende Datenauswertung zu *in vivo*-, *in vitro*- und *in silico*-Informationen aus der Literatur, die Erfassung von Humanerfahrungen zur Häufigkeit entsprechender Allergien, sowie die Veranlassung gezielter *in vivo*- und *in vitro*-Tests zur Ausfüllung von Datenlücken. In einem *in vivo*- Test (LLNA) wurden 4 Härter und 1 Reaktivverdünner getestet, in einem Test zur Proteinbindungsreaktion (DPRA, *in vitro*) wurden 10 Reaktivverdünner untersucht und in einem weiteren Test zur Keratinozytenaktivierung (KeratinoSens™, *in vitro*) wurden 16 Härter und 4 Reaktivverdünner untersucht. Die Wirkstärke konnte nach zwei Hauptkategorien differenziert werden mit 44 von 66 Stoffen, die (tendenziell oder eindeutig oder auf Grund fehlender Informationen) als „stark sensibilisierend“ gewertet werden. 22 von 66 Stoffen wurden entsprechend (tendenziell oder eindeutig) als „gering oder mäßig sensibilisierend“ kategorisiert. Im Projekt wurde das Konzept für ein Epoxidharzinformationssystem (EIS) entwickelt, das a) eine ausführliche Liste mit Stoffcharakteristika zu Epoxidharzinhaltsstoffen enthält, b) Regeln zur Durchführung einer Gemischebewertung aufgrund sensibilisierender Wirkstärke beinhaltet, und c) Hintergrundinformationen zur Umsetzung eines verbesserten Arbeitsschutzes durch Vermeidung von Allergien durch Exposition gegenüber Epoxidharzprodukten bietet.

ABSTRACT

This research project addresses a comparative health assessment focusing on (skin-) sensitising potency a) of single ingredient substances from epoxy resin systems and b) of epoxy resin mixtures on the whole. In this ranking procedure, specifically developed for this purpose, 66 single substances were assigned to potency categories. The assignment is based on a comprehensive data analysis from *in vivo*-, *in vitro*- and *in silico*- information from literature, also capturing human experience on the frequency of respective allergies, as well as commissioning of targeted *in vivo*- and *in vitro*- tests in order to fill in data gaps. The *in vivo* test (LLNA) was used for 4 curing agents and one reactive diluent, an *in vitro* test for protein binding (DPRA) was performed for 10 reactive diluents and, finally, for 16 curing agents and 4 reactive diluents an *in vitro* keratinocyte activation test (KeratinoSens™) was initiated. Differentiation according to potency enabled us to discriminate two major potency categories, where 44 of 66 substances were finally handled as if they were “strong” skin sensitisers (either because of qualified data, or because of a tendency estimate or as a precautionary default). The remaining 22 substances were assigned to the category of “weak or moderate” skin sensitisers (again, either because of qualified data or as a tendency estimate). In this project we also developed a concept for a tripartite “epoxy resin information system” (EIS) with a) a comprehensive list on epoxy resin ingredient substances, containing further substance specific characteristics, b) a calculation module to perform the aggregation mixture assessment, and c) background information to implement improvements in occupational safety in order to avoid allergies from exposure to epoxy resin products.

ZUSAMMENFASSUNG

Der vorliegende Bericht dokumentiert Ergebnisse eines Forschungsprojekts zur vergleichenden gesundheitlichen Bewertung von Epoxidharzsystemen mit Fokus auf deren (haut-) sensibilisierender Wirkstärke. Es war das Ziel, für eine definierte Auswahl von Inhaltstoffen von Epoxidharzsystemen, die mit dem Gefahrenhinweis „kann allergische Hautreaktionen verursachen“ (H 317) eingestuft sind, ein wissenschaftlich fundiertes System anzuwenden, das für möglichst viele dieser Stoffe eine Unterscheidung zwischen stärkeren und schwächeren Allergenen ermöglicht. Ferner sollten diese Differenzierungen in der Wirkstärke der Einzelstoffe in eine Gesamtbewertung von Epoxidharzsystemen münden, um diese Gemische vergleichend zu bewerten. Diese Priorisierung sollte eine Hilfestellung

- bei der Erstellung von Produktrezepturen,
- bei der Produktauswahl aus Anwendersicht und
- bei der Gefährdungsbeurteilung

bieten.

Das Forschungsvorhaben wurde als FP-0384 durch die Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV) gefördert mit weiterer Unterstützung durch die Allgemeine Unfallversicherungsanstalt (AUVA), Wien, durch DEUTSCHE BAUCHEMIE e.V., Frankfurt am Main, und durch PlasticsEurope, Brüssel. Es handelt sich um ein Folgeprojekt eines früheren Vorhabens (FP-0324; DGUV; Abschluss Dezember 2012). Das Vorhaben wurde durch einen fachlichen Beraterkreis aus herstellender Industrie, Berufsgenossenschaften und Wissenschaftlern begleitet („Begleitkreis“). Forschungsnehmer waren das Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG) in Freiburg und der Informationsverbund Dermatologischer Kliniken (IVDK) in Göttingen.

Stoffauswahl

Die Stoffauswahl ergab sich a) durch das Vorläuferprojekt, b) durch Vorschläge aus dem Begleitkreis, c) durch Erfahrungen, die bei der BG Bau aus Sicherheitsdatenblättern eine Relevanz in der Praxis nahelegten und d) durch wissenschaftliche (Literatur-) Hinweise auf neue Rezepturen von Epoxidharzsystemen und darin enthaltene Einzelstoffe. Es wurde Wert darauf gelegt, dass auch Anwendungsbereiche von Epoxidharzsystemen außerhalb der Bauindustrie in der Stoffauswahl widerspiegelt wurden.

Im Vorläuferprojekt wurden bereits 52 Stoffe mit der damals verfügbaren Information und Methodik bewertet. Über das hier vorgestellte Projekt wurde die Stoffauswahl auf 66 Stoffe erweitert. Dabei wurden auch z.B. ein oligomerisierter Härter mit Aminogruppe oder ein modifiziertes Epoxidharzmonomer, das mit einer reduzierten sensibilisierenden Wirkstärke assoziiert wird, einbezogen. Teilweise lag (noch) keine oder keine harmonisierte Einstufung hinsichtlich des sensibilisierenden Potenzials vor, jedoch war der Einbezug in die Stoffliste inhaltlich (durch entsprechende Strukturhinweise oder Testbefunde) begründet.

Es wurde außerdem versucht, auch Gesamtsysteme (Epoxidharzprodukte) in die Bewertungen einzubeziehen (z.B. in Baumärkten verfügbare 2-Komponenten-Kleber auf Epoxidharzbasis oder wässrige Epoxidharzdispersionen).

Bewertungsmethodik für Einzelstoffe

Die Bewertung erfolgte in Teilschritten:

- Datensammlung (ergebnisrelevante Tests, Modellierungen oder sonstige Erkenntnisse für die 66 Stoffe),
- Entwicklung eines Konzepts, wie vorliegende Daten (zum Beispiel Ergebnisse aus *in vitro* Tests) in Bezug auf die Wirkstärke eingeordnet werden sollen,
- Generierung fehlender Daten durch gezielte Testungen,
- Bewertung der einzelnen (neu gewonnenen und vorliegenden) Daten nach der entwickelten Methodik,
- Entwicklung einer Methodik, wie Einzelerkenntnisse zusammengeführt und für eine substanzspezifische aggregierte Bewertung der Wirkstärke eines Stoffs genutzt werden können („Ranking-Methode“),
- Absicherung der gewählten Methodik durch vergleichende Prüfung anderer methodischer Ansätze für integrierte Bewertungen,
- Durchführung des Ranking für alle Stoffe der Stoffliste.

Mit diesem Vorgehen ist es jedoch noch nicht möglich, auch Gemische (Produkte mit mehreren Inhaltsstoffen) insgesamt zu bewerten. Dies erfolgte in einem gesonderten Projektteil.

Für alle genannten Teilschritte lagen bereits Informationen und Ansätze aus dem Vorprojekt vor, die auf Aktualität zu prüfen und die ggfs. zu ergänzen oder anzupassen waren.

Die **Datensammlung** berücksichtigte a) Ergebnisse vom lebenden Versuchstier (*in vivo* Befunde zur Sensibilisierung), b) Ergebnisse zu Teilschritten der Sensibilisierung aus *in vitro* Studien, c) Ergebnisse, die auf Basis von Modellierungen zu chemischen und biochemischen Parametern der betrachteten Substanzen theoretisch (*in silico*) gewonnen wurden, d) Erfahrungsdaten aus dermatologischen Untersuchungen zur Allergieauslösung beim Menschen sowie schließlich auch Literaturdaten aus Fallberichten oder aus der Epidemiologie mit entsprechenden Humanerfahrungen. Zusätzlich zu allgemeinen Literatúrauswertungen waren unter anderem auch Daten zu berücksichtigen, wie sie im Rahmen der europäischen Chemikaliengesetzgebung („REACH“) für eine zunehmende Anzahl von Substanzen inzwischen bereitgestellt werden mussten.

Die jeweils gefundenen Daten waren mit Hilfe eines konsistenten und fachlich abgesicherten **Konzepts** jeweils mit Blick auf ihre Aussage und Aussagekraft zur sensibilisierenden Wirkstärke hin zu analysieren. So musste für Daten aus *in vivo* Studien unter anderem die Qualität des Studiendesigns beurteilt werden, Abschneidekriterien nach anerkannten Maßstäben festgelegt werden, ab wann eine Substanz nach dem Testsystem als schwach oder stark sensibilisierend eingeordnet werden kann oder die Problematik bewertet werden, die sich aus der Applikation der Testsubstanz in einem von mehreren möglichen Trägermaterialien („Vehikel“) ergibt. Bei Ergebnisdaten aus *in vitro* Studien mussten u.a. der Validierungsstatus des jeweiligen Tests eingeordnet und ebenfalls Abschneidekriterien für Hinweise zur Wirkstärke benannt werden. Entsprechend waren differenzierte Überlegungen zur Einordnung von modellierten Ergebnissen oder Humanbefunden erforderlich. Auf diese Weise wurde auch festgelegt, wann die Zuverlässigkeit von Daten als ausreichend zu erachten ist.

Die Datenrecherche und die (zunächst kursorische) Einordnung bisheriger Befunde mit dem beschriebenen Konzept ermöglichte es, gravierende Datenlücken zu erkennen und ein

Programm für gezielte Testungen zu entwickeln, um möglichst viele der erkannten Lücken füllen zu können. Dabei war zu beachten, dass tierexperimentelle Studien heute nur im Ausnahmefall zulässig sind und nur für Fragestellungen beauftragt werden konnten, wo dies entscheidende zusätzliche Erkenntnisse erbrachte oder dies zur grundsätzlichen Absicherung des Gesamtkonzepts dringend erforderlich erschien. Insofern wurden vorwiegend *in vitro* Tests in Auftrag gegeben. Das zuvor entwickelte Konzept zur Einordnung vorliegender Daten aus *in vitro* Tests ermöglichte es, für die eigenen Testungen nur solche auszuwählen, die (unter Berücksichtigung der finanziellen Möglichkeiten) fachlich am ehesten einen qualifizierten zusätzlichen Erkenntnisgewinn ermöglichten. Bei dem Testprogramm war zu beachten, dass häufig nur *relative* Aussagen zur sensibilisierenden Wirkstärke mit dieser Methodik möglich sind. Aus diesem Grunde wurden auch Substanzen in das Testprogramm einbezogen, für die (z.B. aus *in vivo* Befunden) bereits zuverlässige Informationen zur Wirkstärke vorlagen; diese Information konnte dann als „Ankerpunkt“ für vergleichende Aussagen für verwandte Substanzen mit ähnlicher chemischer Struktur dienen.

Nach Vorliegen der Testergebnisse aus dem im Rahmen dieses Projekts ergänzten Testprogramm wurden die gesamten (neu generierten oder bereits vorliegenden) Daten geprüft, um eine **Bewertung** der vorgefundenen Wirkstärke durchzuführen, zunächst isoliert für das einzelne Testergebnis.

Der nächste Teilschritt erfordert die Entwicklung einer Methodik für die **aggregierte Bewertung**, mit der einer Substanz eine abgeschätzte Wirkstärke aus allen nun vorliegenden Daten (einschließlich zusätzlicher Testergebnisse aus dem vorliegenden Projekt) zugeordnet wird. Dieses Konzept wurde im Wesentlichen bereits im Vorprojekt entwickelt. Dabei war insbesondere zu beachten, dass *in vitro* Befunde nur in ihrer Zusammenschau eine Bewertung der Wirkstärke zulassen, da der vielstufige Prozess der Sensibilisierung erst durch mehrere parallele *in vitro* Testbefunde insgesamt abgebildet wird.

Die im Vorprojekt gewählte **Unterteilung der Stoffe in 4 Wirkkategorien** (gestufte Klassen nach Wirkstärke) wurde in für dieses Projekt übernommen. Diese Wirkkategorien lauten:

- GMS (geringe bis mäßige Sensibilisierungsstärke)
- HS (hohe Sensibilisierungsstärke)
- SHS (sehr hohe Sensibilisierungsstärke)
- U (unbekannte Sensibilisierungsstärke)

Substanzen der Kategorie U wurden der Kategorie „HS“ gleichgesetzt (bei Mangel an quantitativ verwertbarer Information wurde ein Stoff so bewertet, als sei er stark sensibilisierend). Zusätzlich wurden „Tendenzgruppen“ gebildet: Stoffe der Kategorie U, zu denen deutliche Hinweise dafür existieren, dass sie nur schwach (U→Tendenz GMS) oder eher stark (U→ Tendenz HS) wirksam sind, wurden gesondert ausgewiesen, um dies regulatorisch differenziert berücksichtigen zu können. Die Kategorien wurden sowohl für das Einzeltestergebnis wie auch für die aggregierte Bewertung der Substanz angewandt.

Im LLNA-Test (*in vivo* Methode mit Mäusen) wurden 4 Härter und 1 Reaktivverdünner getestet. Zwei *in vitro* Tests wurden im Projekt eingesetzt: 10 Reaktivverdünner wurden mit dem Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA-Test) untersucht und 20 Stoffe (16 Härter, 4 Reaktivverdünner) wurden in dem Keratinozytenaktivierungstest (KeratioSens™) untersucht.

Der abschließende Teilschritt bei der Bewertung der Einzelstoffe war die Anwendung der aggregierten Bewertungsmethodik zur Erstellung des **Rankings**, also einer Liste der Stoffe

aus Epoxidharzsystemen mit Einteilung nach schwächer oder stärker wirksamen Substanzen in Bezug auf die sensibilisierende Wirkstärke. Dieses Ranking sollte auch eine pragmatische Entscheidung für den Fall ermöglichen, dass die Datenlage noch immer unzureichend für eine eindeutige Wirkstärkeaussage bleibt (Defaultvorgehen für den Fall des Nichtwissens) oder für den Fall, dass nur Tendenzaussagen möglich sind, die jedoch noch immer größere Unsicherheiten beinhalten.

Bevor die Methodik zur aggregierten Bewertung aus dem Vorprojekt übernommen werden konnte, war jedoch zu überprüfen, ob aus anderen **integrierten Teststrategien** (ITS) inzwischen Ansätze für eine solche aggregierte Bewertung vorliegen. Tatsächlich wurden seit dem Vorläuferprojekt internationale interessante Ansätze entwickelt, um verschiedene Testergebnisdaten und Modellierungsbefunde zu einer integrierten Bewertung zusammenzuführen. Es musste also geprüft werden, ob solche ITS für das vorliegende Projekt integriert werden konnten, ob der eigene Ansatz für eine aggregierte Bewertung kompatibel mit Ergebnissen aus ITS ist und ob zusätzliche Informationen aus diesen ITS gewonnen werden können.

Insbesondere ergab sich dabei die Gelegenheit, eine ITS anzuwenden, bei der zunächst die Wirkstärke in dem oben genannten *in vivo* Test (LLNA) aufgrund von *in vitro* Daten, der Bioverfügbarkeit und modellierter mechanistischer Zusammenhänge über eine *in silico* Analyse abgeschätzt wird (ITS-3; Jaworska et al., 2015). Dieser Ansatz konnte für insgesamt 51 Stoffe aus der hier zugrunde gelegten Stoffliste von Epoxidharzinhaltsstoffen herangezogen werden, diente der Absicherung der Ergebnisse über ein unabhängiges Bewertungsverfahren und wurde auch als Entscheidungshilfe genutzt, um Tendenzaussagen zu bilden oder um einzelne Bewertungen von der Tendenzaussage in eine eindeutige Bewertungskategorie zu überführen.

Ziel der Literaturliteraturauswertung zu **Humandaten** war es, publizierte Daten zur sensibilisierenden Wirkung von Inhaltsstoffen von Epoxidharzsystemen an der Haut des Menschen zusammenzustellen und zu bewerten. Dabei lag der Schwerpunkt auf Untersuchungen an Patienten, die sich durch den Kontakt mit einem Epoxidharz-Produkt gegen einen oder mehrere Inhaltsstoffe sensibilisiert haben, und auf klinisch-epidemiologischen Daten, z.B. aus Reihenuntersuchungen. Aufgrund der ausgewerteten Literatur und unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Vorgängerprojektes FP-0324 wurde versucht, die Bedeutung der Epoxidharzsystem-Komponenten als Allergene quantitativ abzuschätzen.

Hierzu wurden drei Kategorien gebildet:

- H = häufiges (und daher bedeutendes) Allergen bei Ekzempatienten mit Exposition gegenüber Epoxidharzsystemen.
- S = seltenes (und daher weniger bedeutendes) Allergen bei Ekzempatienten mit Exposition gegenüber Epoxidharzsystemen.
- U = Häufigkeit und Bedeutung als Allergen unbekannt; die Substanz wurde am Menschen zu wenig oder gar nicht allergologisch untersucht, so dass man keine aussagekräftige diesbezügliche Abschätzung vornehmen konnte.

Die Befunde aus Humandaten konnten jedoch die Frage nach der Wirkstärke nicht abschließend beantworten, sondern nur die Frage nach der Häufigkeit des Vorkommens von der Allergie. Die Häufigkeit kann jedoch implizit auch durch die Wirkstärke beeinflusst sein, wobei eine Trennung zu den Parametern: Anwendungshäufigkeit und –konzentration jedoch nicht möglich ist. Insofern stellen die Befunde aus Humanbeobachtungen ein ergänzendes Ergebnis des Forschungsprojektes dar, das über das Ranking hinausgeht.

Ergebnisse: Ranking von Einzelstoffen

Die Überprüfung der bereits im Vorprojekt angewandten Methodik hinsichtlich der Bewertung von Einzeltests und für die aggregierte Bewertung (Rankingmethode) zeigte, dass die Bewertungsprinzipien aufrechterhalten werden und durch Ergebnisse internationaler Weiterentwicklungen von Testsystemen bestätigt werden konnten.

Unter Berücksichtigung der „Tendenzgruppen“ ergaben sich 6 Kategorien für die Einteilung der 66 Stoffe nach ihrer Wirkstärke:

Eine Kategorie „SHS“ ohne Abstriche wurde nicht gefüllt. 7 Stoffe wurden jedoch in die höchste Kategorie eingeordnet (Tendenzgruppe HS→SHS), darunter die derzeit auf dem Markt dominierenden Bisphenol-A- und Bisphenol-F-Harze.

Eindeutig als Stoffe mit hoher Sensibilisierungsstärke wurden 16 Stoffe identifiziert, darunter auch neuere Modifikationen der Epoxidharzmonomere, wie sie bisher in der Praxis noch kaum eine Rolle spielen. Diese Harze unterscheiden sich jedoch bereits in der (etwas geringeren) Wirkstärke von den oben genannten Standardharzen. Zahlreiche Aminhärter und Reaktivverdünner (Glycidylether) sind in dieser Gruppe vertreten.

Zusätzlich müssen 5 Stoffe in ihrer Wirkungsstärke ähnlich der Kategorie HS eingeordnet werden, wobei jedoch die bei diesen Stoffen vorliegende Datenlage noch relevante Unsicherheiten beinhaltet. Daher bilden diese Stoffe eine eigene Kategorie (Tendenzgruppe U→HS). Auch hier ist wiederum insbesondere auf Glycidylether zu verweisen.

Für ca. 24 % der Substanzen (n = 16) war die Datenlage zum Zeitpunkt dieses Projekts noch immer so unbefriedigend, dass ihnen keine Wirkstärke zugeordnet werden kann. Dazu konnten sowohl Härter wie Reaktivverdünner gehören.

Trotz noch immer unbefriedigender Datenlage konnte eine weitere Kategorie von Stoffen ausgewiesen werden (n = 9 Stoffe; knapp 13 %), bei denen deutliche Hinweise darauf vorliegen, dass sie nur eine schwache oder mäßige sensibilisierende Wirkstärke besitzen (Tendenzgruppe: U→GMS). Dazu gehörte unter anderem ein vom Isophorondiamin abgeleiteter oligomerisierter Härter, wobei jedoch Isophorondiamin zur Kategorie HS gehört.

Schließlich konnte für 13 Stoffe (knapp 20 %) auf Basis einer qualifizierten Datenlage geschlussfolgert werden, dass es sich hier um mäßig oder schwach wirksam sensibilisierende Stoffe handelt (Kategorie: GMS).

Die Analyse mit Hilfe der **ITS-3 Methode** (Jaworska et al., 2015) konnte das zuvor durchgeführte Ranking die Wirkstärkenkategorie in den meisten Fällen bestätigen (31 Stoffe). Für 11 Stoffe, die bisher der Kategorie U zugeordnet wurde, konnten so zumindest erste Hinweise auf eine Kategoriezuordnung erfolgen. Es wurden jedoch auch die Grenzen von modellierten Abschätzungen deutlich: für ein abschließendes Ranking wurde im Falle widersprüchlicher Ergebnisse den experimentellen Befunden eine höhere Bedeutung zugeordnet als der Vorhersage nach ITS-3.

Kategorie	Anzahl	Stoffe
HS→SHS	7	Bisphenol A-Harze; Reaktionsprodukt Bisphenol A Epichlorhydrin; Bisphenol-A-Epichlorhydrin MW 340; Bisphenol F-Harze; Bisphenol-F-Epichlorhydrin; Phthalsäureanhydrid; Phenylglycidylether
HS	16	Epoxidharz-Monomer a) (aus O'Boyle); Epoxidharz-Monomer b) (aus O'Boyle); Epoxidharz-Monomer c) (aus O'Boyle); Ethylendiamin; Diethylentriamin; Trimethylhexamethylendiamin (TMD); Triethyltetramin; Isophorondiamin; m-Xylidendiamin (MXDA); Tetrahydrophthalsäureanhydrid; Hexahydrophthalsäureanhydrid; 1,4-Butandiol diglycidylether; 1,6-Hexandiol diglycidylether; Trimethylolpropan triglycidylether; o-Kresylglycidylether; Kresyl-glycidylether, Isomerengemisch
U→HS	5	Dipropylentriamin; N-Aminoethylpiperazin; Neopentylglykoldiglycidylether; 2-Ethylhexylglycidylether; p-tert.-Butylphenol monoglycidylether
U	16	Bis(aminopropyl)laurylamin; 3-Cyclohexylaminopropylamin; 1,2-Diaminocyclohexan (DCH); 1,3-Cyclohexylen-bis(methylamin); Formaldehyd, Polymer mit Benzenamin, hydriert; Polyethylenpoly-, triethyltetramin; Methyltetrahydrophthalsäureanhydrid; Methylhexahydrophthalsäureanhydrid; 3-((6 Aminotrimethylhexyl)amino)propionitril; Bis[(dimethylamino)methyl]phenol; Dipropylenglycol-diglycidyl ether; Cyclohexandimethanol-diglycidylether; Cyclohexandimethanoldivinylether; Propantriol-glycidylether (1,2,3-Propantriol-glycidylether bzw. 1,2,3-Propanetriol, polymer mit 2-(chloromethyl)oxiran); 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat; 4,4'-Methylenbis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)anilin] (TGMDA)
U→GMS	9	N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan; 4,4'-Diaminocyclohexylmethan; Bis(4-(1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethylamino)-3-methylcyclohexyl)methan; m-Xylendiamin/Acrylonitril Adduct; N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan; Polyoxyalkylenamin, 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan ; Oligomerisierter Härter: 4,4'-Isopropyliden-diphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin; 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol; C12/C14-Monoglycidylether)
GMS	13	4,4' Diaminodiphenylmethan; Tetraethylenpentamin; Pentaethylenhexamin; Polyethylenpolyamin; Polyethylenamin; 3-Aminopropyltriethoxysilan; N,N-Dimethylcyclohexanamin; tert-Butylphenol; Bisphenol A; Butylglycidylether; Versaticsäureglycidylester; Polypropylenglykoldiglycidylether/ Polyoxypropylen diglycidylether; Polypropylenglycol-chloromethyloxiran polymer

Ergebnisse zu Einzelstoffen aus Humandaten

Aus der Literaturanalyse von Humandaten konnte keine Wirkstärkenabschätzung erfolgen, jedoch eine Zuordnung der Inhaltsstoffe von Epoxidharzsystemen zu Häufigkeitskategorien.

- 14 Substanzen wurden als häufige Allergene („H“) in Epoxidharzsystemen angesehen.
- 15 Substanzen wurden als seltene Allergene („S“) in Epoxidharzsystemen angesehen.
- Für 37 Substanzen war eine quantitative Abschätzung nicht möglich („U“).

Zudem wurden im vorliegenden Rahmen Daten des IVDK der Jahre 2012 bis 2015 ausgewertet. In diesen 4 Jahren wurden in den 56 am IVDK beteiligten dermatologischen Abteilungen insgesamt 50.102 Patienten epikutan getestet. Ein Epoxidharz auf Basis von Bisphenol A-diglycidylether (DGEBA) wurde im Rahmen der Standardreihe bei 85% der Patienten getestet. Es handelte sich also nicht um gezielte Epikutantestungen bei Patienten mit konkretem Verdacht auf eine Epoxidharz-Allergie. Bei der Analyse der Testreaktionen auf die einzelnen Reaktivverdünner und Amin-Härter fiel auf, dass 18% bis 28% der allergischen Reaktionen auf Reaktivverdünner und sogar 24% bis 78% der Reaktionen auf Amin-Härter bei Patienten auftraten, die *nicht* gegen das DGEBA-Epoxidharz sensibilisiert waren.

Da eine Exposition gegenüber diesen Verbindungen außerhalb von Epoxidharzsystemen selten und daher relativ unwahrscheinlich ist, erscheinen auch die Sensibilisierungen gegen Amin-Härter und Reaktivverdünner, die unabhängig von einer Sensibilisierung gegen das DGEBA-Epoxidharz auftreten, für die übergeordnete Fragestellung des Forschungsvorhabens von Bedeutung. Im Fall des Isophorondiamin ist allerdings zu berücksichtigen, dass Sensibilisierungen auch durch die Exposition gegenüber Isophorondiisocyanat erworben werden können. Die Häufigkeit der Sensibilisierungen gegen Isophorondiamin durch die Exposition in Epoxidharzsystemen konnte folglich möglicherweise bei der Datenanalyse überschätzt worden sein. Allergische Reaktionen auf einen bestimmten Stoff sind zwar in der Regel Ausdruck einer Sensibilisierung gegen diesen Stoff durch Exposition gegenüber genau diesem Stoff. Sie können aber auch dadurch zustande kommen, dass sich der Betroffene gegen einen anderen, chemisch verwandten Stoff sensibilisiert hat, und nun nicht nur auf sein primäres Allergen, sondern auch auf weitere chemisch verwandte Stoffe allergisch reagiert (immunologische Kreuzreaktion).

Epoxidharzinformationssystem

Neben der Durchführung eines toxikologisch gestützten qualifizierten Rankings und der Dokumentation der Relevanz von sensibilisierenden Epoxidharzinhaltsstoffen auf Basis der Häufigkeit von Allergien aus Humanbeobachtungen war es das Ziel des Forschungsprojekts, eine praxisnahe Hilfe zu bieten, die bei Entscheidungen unter dem Blickwinkel des Arbeitsschutzes herangezogen werden kann. Zu diesem Zweck wird ein „Epoxidharz-informationssystem“ (EIS) vorgeschlagen. Es handelt sich hierbei um eine über das Internet verfügbare Plattform, über die verschiedene praxisrelevante Informationen abgefragt werden können und die auch Rechenregeln bietet, mit deren Hilfe vom Anwender die Wirkstärkebewertung quantitativ durchgeführt werden kann.

Das vorgeschlagene EIS besteht aus drei Teilen:

- der EIS-Liste
- dem EIS-Modul zur Berechnung einer Gefährdungszahl für Epoxidharzgemische
- den (praxisorientierten) EIS-Hintergrundinformationen.

Es ist vorgesehen, dass die Internet-Plattform außerhalb des hier dokumentierten Projektrahmens eingerichtet wird und zu jedem der drei Teile Startinformationen aus diesem Projekt eingespeist werden. In der Folge sollen EIS-Liste, Gemischieberechnung und Hintergrundinformationen durch einen Expertenkreis erweitert, aktualisiert und erforderlichenfalls modifiziert werden.

EIS-Liste

Die EIS-Liste stellt eine erweiterte Liste zu den Inhaltsstoffen von Epoxidharzsystemen dar. Die Erweiterungen umfassen:

- Die Stoffauswahl kann zusätzliche Substanzen und möglicherweise auch nichtsensibilisierende Inhaltsstoffe aus Epoxidharzsystemen beinhalten.
- Die Stoffcharakterisierung geht über die sensibilisierende Eigenschaft hinaus und enthält neben der Identität und Einstufung nach Einstufungs- und Kennzeichnungsrichtlinie der EU auch z.B. explizite Hinweise zu krebserzeugenden, erbgutverändernden oder reproduktionstoxischen Eigenschaften, Daten zur reizenden oder ätzenden Wirkung und zur Hautpenetrationsfähigkeit sowie relevante Arbeitsplatzgrenzwerte.
- Hinweise zur Häufigkeit von mit einem Stoff in Verbindung gebrachten Allergien (vgl. Ergebnisse aus Humandatenauswertung) werden aufgelistet.
- Als Hinweis auf die Umweltrelevanz wird die Wassergefährdungsklasse dokumentiert.
- Übliche Verwendungsmengen im Produkt werden zur Einordnung berichtet.

Eine Startversion der EIS-Liste wurde im Rahmen des vorliegenden Projekts entwickelt.

EIS-Gemischiebewertung

Im Rahmen des Forschungsprojekts wurde ein Konzept zur Gemischiebewertung entwickelt und an ersten Beispielen validiert, das für die praxisnahe Verwendung der Informationen aus dem Einzelstoff-Ranking zentrale Bedeutung hat: in der Praxis werden Gemische eingesetzt und eine isolierte Bewertung der Einzelstoffe führt nicht weiter, wenn nicht die Auswirkungen auf die Gesamtbewertung eines Gemischs betrachtet werden. Mögliche Substitutionsentscheidungen von Einzelstoffen oder Epoxidharzsystemen (als Gesamtprodukt) erfordern diese integrative Betrachtung. Jegliche gesundheitliche vergleichende Abwägung geht von der Voraussetzung aus, dass die Produkte auch in der (technischen) Anwendbarkeit Substitute darstellen.

Die Methodik der Gemischiebewertung beinhaltet folgende Elemente:

- Die Zuweisung von Zahlenwerten („Noten“) in Abhängigkeit von der Wirkstärkenkategorie zu Einzelstoffen,
- Die Berücksichtigung der Konzentration (Mengen-%) von sensibilisierenden Inhaltsstoffen im Gemisch,
- Einen Verstärkungsfaktor für den Fall, dass Inhaltsstoffe die Hautbarriere schädigen oder die Penetration durch die Haut verstärken,
- Eine modifizierte Additionsregel für die Gesamtwirkung mehrerer sensibilisierender Stoffe mit Berechnung einer (aggregierten) Gesamt-Gefährdungszahl,
- Die Ausweisung von Kategorien für Gefährdungszahlen, wann diese sich nur irrelevant oder signifikant unterscheiden („Banding-Ansatz“).

Bei einem zwei-Komponenten-Epoxidharzsystem wird zweistufig vorgegangen: zunächst wird eine Gefährdungszahl (GZ) für die Einzelkomponente berechnet (GZ für Harz, GZ für Härter) und dann wird eine Gefährdungszahl für das Gesamtprodukt (mit Anwendung der Vorgaben über das Mischungsverhältnis, z.B. 3:1) kalkuliert. Maßgeblich ist in der Regel die Gefährdungszahl für das Gesamtgemisch.

Erste Beispielsberechnungen mit realistischen Daten aus Sicherheitsdatenblättern konnten signifikante Unterschiede in der Gesamt-Gefährdungszahl (in Bezug auf die sensibilisierende Wirkstärke von Epoxidharzprodukten) für technische Alternativen zeigen.

EIS-Hintergrundinformationen

Der Abschnitt „Hintergrundinformationen“ innerhalb von EIS ist dafür vorgesehen, weitere Hilfestellungen zur Umsetzung des Arbeitsschutzes beim Umgang mit Epoxidharzsystemen zu liefern. Diese können sich zum Beispiel beziehen auf:

- die sachgemäße Interpretation der Daten der EIS-Liste,
- die Diskussion anderer gesundheitlich relevanter Wirkungen von Epoxidharzinhaltsstoffen und deren Relevanz für beruflich gegenüber Epoxidharzen exponierten Personen (z.B. Diskussion der Relevanz von „Bisphenol-A“ in Epoxidharzen unabhängig von der sensibilisierenden Wirkung),
- die sachgerechte Interpretation der Ergebnisse der EIS-Gemischebewertung,
- Hinweise zur Bewertung von besonderen Produkten (z.B. Epoxidharz-Dispersionen, Baumarkt-2-Komponentensystemen wie „powerkits“, etc.)
- technische und organisatorische Maßnahmen zur Vermeidung der Sensibilisierung durch Epoxidharzinhaltsstoffe,
- Hinweise zum Verständnis der Allergieentstehung für Nichtmediziner,
- Diskussion zur Frage, ob neben dem Hautkontakt auch luftgetragene Belastung mit bestimmten Epoxidharzinhaltsstoffen zur Sensibilisierung führen kann.

Im Rahmen dieses Projekts wurde als Beispiel ein Beitrag erarbeitet, der Erläuterungen zum Verständnis von Kreuzallergien durch Epoxidharzinhaltsstoffe liefert.

Schlussfolgerung und Ausblick

Die Projektergebnisse ermöglichen eine qualifizierte Einordnung der Wirkstärke für zahlreiche sensibilisierende Inhaltsstoffe von Epoxidharzsystemen und bieten damit eine Basis, um Gefährdungen besser einordnen und aus gesundheitlicher Sicht begründete Substitutionen sachgerecht vornehmen zu können. Dabei ist in der Regel nicht zu erwarten, dass ein sensibilisierender Stoff durch einen anderen ohne jedes sensibilisierendes Potenzial ersetzt werden kann. Es ergeben sich jedoch Möglichkeiten, die Wahrscheinlichkeit einer Sensibilisierung durch die Berücksichtigung dieser Erkenntnisse zu reduzieren. Die Auswahl weniger sensibilisierender Stoffe enthebt jedoch nicht von der Notwendigkeit, technische und organisatorische Schutzmaßnahmen zum Schutz vor beruflich bedingten Hautallergien in vollem Umfang durchzuführen und aufrecht zu erhalten.

Über die mögliche Bewertung der 66 Substanzen aus Epoxidharzsystemen hinaus stellt dieser Bericht auch ein Kompendium für eine aktuelle Analyse bestehender Testmethoden auf sensibilisierende Eigenschaften für andere sensibilisierende Stoffe dar. Die entsprechenden Ausarbeitungen und die Bewertungsmethode sind für weitere Anwendungszwecke geeignet.

Die Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke von Epoxidharzinhaltsstoffen im Rahmen dieses Projekts war jedoch durch weiterhin bestehende gravierende Datenlücken nur begrenzt möglich. Entsprechend enthält die Kategorie „U“ (unbekannte Wirkstärke) noch viele Stoffe. Zusätzlich sind für zahlreiche Substanzen aufgrund von Informationslücken derzeit nur Tendenzaussagen möglich. Es ist zu erwarten, dass hier in Zukunft Verbesserungen eintreten, a) wegen der im Rahmen von REACH geforderten Ermittlungspflichten auch für niedertonnagige Stoffe, b) wegen der Weiterentwicklung (Validierung, Ergänzung) der *in vitro* und *in silico* Methoden zur Durchführung der hier gewünschten Wirkstärkenabschätzung. Es ist stark anzunehmen, dass hier Fortschritte erzielt werden, da aufgrund von nur noch selten und nur für Forschungszwecke genehmigten *in vivo* Studien entsprechende Ersatzverfahren dringend gefordert werden. Eine erfolgsversprechende Umsetzung der Projektergebnisse bedeutet demnach auch die notwendige Etablierung des Epoxidharz-informationssystems EIS und die kontinuierliche Pflege/Aktualisierung des dort dokumentierten Sachstands.

SUMMARY

This report documents results from a research project comparing epoxy resin systems with regard to skin sensitising potency. We intended to provide a ranking (lower or higher sensitising potency) for a defined set of epoxy resin ingredient substances, which are currently classified as skin sensitisers and marked by the hazard statement “*may cause an allergic skin reaction*” (H317, CLP). In addition, potency ranking of single substances should subsequently be aggregated to assess the sensitising potency of mixtures (complete epoxy resin product). Thus, potency classification of single substances and mixtures is thought to assist

- formulating future epoxy resin products,
- selection of products from the viewpoint of users safety and health,
- performing workplace health risk assessments.

The research project (project no. FP0384) was funded by German Social Accident Insurance (DGUV) with additional support by General Accident Insurance Association (Austria; AUVA), Vienna, by Deutsche Bauchemie e.V., Frankfurt/M, and by PlasticsEurope, Brussels,. FP0384 is a follow-up project from earlier work (FP-0324; DGUV, finalised December 2012). The project was accompanied by a scientific advisory committee from producing industry, employers’ mutual indemnity associations and scientific experts. Contracted consultants were the Research and Advisory Institute on Hazardous Substances (FoBiG, Freiburg and the Information Network of Departments of Dermatology (IVDK), Goettingen/Germany.

Selection of Substances

Substance selection resulted from a) the previous project, b) suggestions by the scientific advisory committee, c) experiences from the employers’ mutual indemnity association for the construction industry (BG Bau), d) scientific literature search. It was specifically considered to include also other uses of epoxy resins besides construction industry.

In the previous project 52 substances were included and assessed according the methodology and available data at that time. For the current project the substance list was extended to 66 substances. For example, an oligomeric curing agent with amino group or a modified epoxy resin monomer associated with reduced sensitising potency have been included in the substance inventory. In a few cases, there was no (or no harmonised) classification on sensitising potential already assigned to the substances, but this hazard property had to be assumed from substances’ characteristics. It was also intended to include aqueous epoxy resin emulsions and two component epoxy glues, readily available in general consumer markets for construction products.

Assessment methodology for single substances

Epoxy resin ingredients’ sensitising potency assessment was performed by a stepwise approach:

- data retrieval (test results, modelling, further findings for all 66 substances),
- development of an assessment strategy to transform these results (e.g., data from *in vitro* testing) into potency categories,
- reduction of data gaps by performing targeted tests (*in vivo*, *in vitro*, modelling),
- sensitising potency assessment based on these data and guidance principles for all substances,

- development of a methodology to combine single outcome results for an aggregated substance specific assessment for the respective epoxy resin ingredient (“ranking”),
- validation of the method used by comparative analysis of other methodological approaches for integrative assessments,
- finally, performing the concluding substance specific ranking.

This procedure allows assessing the single substances, but it does not yet enable to compare mixtures (epoxy resin products) on the whole. This is done in a separate section of the project. For all steps of this procedure information and preliminary approaches were available from the previous project, which, however, had to be adapted and supplemented.

Data retrieval included a) results from animal studies (*in vivo* findings on sensitisation), b) results addressing the various partial steps of the multistep mode of action testing by *in vitro* studies, c) results from chemical and biochemical modelling (“structural activity relationship” analysis by *in silico* approaches), d) experiences from dermatological examinations and literature results linked to human data (case studies or epidemiology). Some of these data were found analysing REACH registration documents, which usually include an assessment on skin sensitisation.

The output from data retrieval had to be analysed based on a consistent and qualified **concept, how to extract potency information** from the respective sources. Specifically, *for in vivo* studies, this concept includes, inter alia, a reliability assessment of the respective test, a cut-off discussion (with link to sensitising potency) or principles how to handle potential influences by the vehicle of a test system. For *in vitro* studies, the validation status by international regulatory agencies had to be accounted for. Again, cut-off values had to be considered. Similar considerations had to be used for human data. Certain minimum quality requirements had to be considered to include or deselect test results.

Based on data retrieval and (initially preliminary) categorization of existing data with the concept described above, it was possible to detect serious data gaps and to develop a program for **targeted testing**, in order to fill such gaps for as many substances as possible within the framework of this project. It had to be considered that experimental testing in animals today is only permitted in exceptional cases and only for problems, where this was regarded essential for substantial gain of knowledge or for validation of the overall concept. The concept developed before to categorise *in vitro* tests for the purpose of the assessment of sensitising potency was used to perform only such additional *in vitro* tests, which contributed most to eliminate data gaps (within the financial framework of this project). It had to be considered that *in vitro* test results would usually only permit *relative* information on potency – therefore, in order to scale the resulting information and link it to a reference potency, also such substances had to be included into the respective *in vitro* test, for which qualified *absolute* potency information was already available.

After test results were available, all the outcomes (reported from literature or own testing) had to be analysed to be transformed into potency categories.

For an overall methodology then a procedure had to be developed how to perform an **aggregated assessment**, where all data attributable to one substance were looked at to integrate the single outcomes to assign an overall category for sensitising potency. This concept had been developed already largely in the in the previous project. One key issue in

this aggregational approach is to adequately combine the single *in vitro* results, which all relate to different steps of sensitisation in a multistep mode of action process.

The differentiation of four potency categories for the substances, as developed in the previous project, was adopted. These categories are:

- GMS (low or moderate sensitising potency)
- HS (high sensitising potency)
- SHS (very high sensitising potency)
- U (unknown sensitising potency).

Substances of the category U were regarded as being equally potent as are substances from category "HS" as a default assumption. In addition, various "tendency categories" were established: for example, a substance from category "U" where some but limited data indicate low potency, was assigned to the tendency group: U→GMS. Similarly, tendency groups U→HS and HS→SHS were defined to differentiate potency categories.

In the LLNA test (*in vivo* test with mice) 4 curing agents and 1 reactive diluent were tested. Two different *in vitro* Tests were employed in this project: 10 reactive diluents were tested with the *Direct Peptide Reactivity Assay* (DPRA) and 20 substances were examined by a keratinocyte activation test (KeratinoSens™).

From all these outcomes the **ranking** was performed, i.e., a list of all substances with assigned potency values was established. It was considered that also for substances with no or limited information, a default ranking result should be assigned.

Before the previous methodology for the ranking was adopted, we **analysed integrated test strategies** (ITS) from other authors, how those would address such aggregated assessments. In fact, since the time of the previous project some relevant ITS have been developed. Therefore we analysed how to integrate such assessment results into the procedure used in this project and how to make use of some additional findings from ITS. Specifically, we had the opportunity to apply an ITS, which is designed to estimate a result for a hypothetical *in vivo* Test (LLNA), combine this estimate with the outcome of *in vitro* testing, consider bioavailability and link all the result estimates by modelling with *in silico analysis*. This ITS is called ITS-3 (Jaworska et al., 2013). This approach was taken for 51 substances in total and was used to support or to supplement our assessment approach.

The objective of the literature search for **human data** was to collect and analyse data on elicitation of allergic responses on skin of humans. The focus of the analysis was directed towards patients, which were sensitised by contact to an ingredient (or some ingredients) of epoxy resin systems with further focus on clinical-epidemiological data, e.g., from serial examinations from humans. Based on the previous project and literature results, we tried to perform a relevance ranking for the substances in epoxy resin systems. For this, four categories were established:

- Category H = frequent (and therefore relevant) allergen within eczematous patients with exposure to epoxy resins
- Category S = rare (and therefore less relevant) allergen within eczematous patients with exposure to epoxy resins
- Category U = frequency and relevance of this substance is unknown; allergic symptoms from this substance have not been examined sufficiently for humans, to provide a qualified assessment.

However, results from human data do not directly answer on the question of potency, but only on frequency of the respective allergies. But frequency may implicitly be influenced by potency, where the influential factors cannot be separated. Therefore, observations from human data provide supplemental information beyond the potency ranking of sensitisers.

Results: ranking of single substances

The re-examination of the methodology, which was already applied in the previous project regarding single test outcomes and for aggregated assessments (ranking methodology), demonstrated that the principles of this assessment may be maintained. This methodology is also corroborated by the results of more recent internationally recognised assessment strategies and specific assessment results.

If “tendency groups” are separately displayed, the 66 substances from the substance inventory can be assigned to 6 different categories.

No substance was assigned to the definite category “SHS”. However, 7 substances were categorized for tendency HS→SHS. Those included the resins which are currently dominating the market for resins (bisphenol A diglycidyl ether or bisphenol-F based epoxy resins).

16 compounds (about 24 %) were clearly assignable to category “HS” (high sensitising potency). Those included recent modifications of epoxy resin monomers (which are not yet relevant in terms of practical use). Such resins demonstrate a somewhat lower sensitising potency compared to the standard resins. Many amine containing curing agents and reactive diluents (glycidyl ethers) belong to this group.

In addition, 5 substances have to be categorised similarly to category HS, but data are not yet sufficient for unambiguous assignment to this group. They belong to the tendency group U→HS. Again, some glycidyl ethers are contained in this category.

For about 24 % of the substances (n = 16), extent and quality of data was regarded as too limited to assign any potency to such compounds (Category “U”). Curing agents as well as reactive diluents may belong to this category.

Although still with no satisfactory overall result, a set of 9 substances (close to 13 %) was assigned to a tendency category U→GMS, i.e., those may be regarded as probably of low or moderate sensitising potency. This group includes one substance, which is an oligomeric curing agent, derived from isophoron diamine (which, itself, is grouped into category HS).

Finally, 13 substances (close to 20 %) permitted assignment to the weaker sensitisers’ group (category GMS).

Analysis with the **ITS-3 method** (Jaworka et al., 2015) largely confirmed this ranking. However, also limits of modelling were detected. If modelling deviated significantly from experimental results, priority for ranking was attributed to experimental data.

Category	number	substance
HS→SHS	7	Bisphenol A epichlorohydrin polymer; Araldite B; Bisphenol A diglycidyl ether; Formaldehyde, polymer with 2-(chloromethyl)oxirane and phenol; Phenol, polymer with formaldehyde, glycidyl ether; Phthalic anhydride; Phenyl glycidyl ether
HS	16	modified epoxy resin monomers (from O'Boyle a), b) and c)); Ethylenediamine; Diethylenetriamine; Trimethylhexamethylenediamine; Triethylenetetramine; Isophorone diamine; 1,3-Xylenediamine; Tetrahydrophthalic anhydride; Hexahydrophthalic anhydride; 1,4-Diglycidloxybutane; 1,6-Hexanediol diglycidyl ether; Trimethylolpropane, (chloromethyl)oxirane polymer; o-Cresol glycidyl ether; Cresyl glycidyl ether
U→HS	5	Dipropylenetriamine; N-(2-Aminoethyl)piperazine; Neopentyl glycol diglycidyl ether; 2-Ethylhexyl glycidyl ether; 4-tert-Butylphenyl glycidyl ether
U	16	Bis(aminopropyl)laurylamine; N-(3-Aminopropyl)cyclohexylamine; 1,2-Diaminocyclohexane; 1,3-Cyclohexanebis(methylamine); Di(3-aminopropoxy)ethane; Formaldehyde, polymer with benzenamine, hydrogenated; Amines, N-C12-18-alkyltrimethylenedi-, diacetates; Tetrahydromethylphthalic anhydride; Methylhexahydrophthalic anhydride; 3-((6-Aminotrimethylhexyl)amino)propionitrile; Bis((dimethylamino)methyl)phenol; Dipropylene glycol diglycidyl ether; 1,4-Bis(glycidylmethyl)cyclohexane; Cyclohexane, 1,4-bis((ethenoxy)methyl)-; 1,2,3-Propanetriol, glycidyl ethers (3,4-Epoxy-cyclohexyl)methyl 3,4-epoxycyclohexylcarboxylate; Tetraglycidyl-4,4'-methylene dianiline
U→GMS	9	N,N-Dimethyl-1,3-propanediamine; 1,4-Bis(aminocyclohexyl)methane; Bis(4-(1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethylamino)-3-methylcyclohexyl)methane; Benzenedimethanamine, N-(2-cyanoethyl) derivs.; Aminoethylaminopropyl-trimethoxysilane; 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan; 4,4'-(1-methylethylidene)bis-, polymer with 5-amino-1,3,3-trimethylcyclohexanemethanamine and (chloromethyl)oxirane; 2,4,6-tris(dimethylaminomethyl)phenol; C12-14-Alkyl glycidyl ether
GMS	13	4,4'-Methylenedianiline; Tetraethylenepentamine; Pentaethylenhexamine; Amines, polyethylenepoly-; Poly(N-ethenylamine); 3-Aminopropyltriethoxysilane; N,N-Dimethylcyclohexylamine; p-tert-Butylphenol; Bisphenol A; n-Butyl glycidyl ether; 2,3-Epoxypropyl neodecanoate; Polypropyleneglycol diglycidyl ether; Polypropylene glycol, (chloromethyl)oxirane polymer

Results for single substances from analysis of human data

Literatur survey on human data usually does not permit to categorise sensitising potency, but ingredients of epoxy resin systems may be categorised with regard to frequency of observed allergies. Accordingly,

- 14 substances were judged to be frequent allergens in epoxy resin systems (category “H”),
- 15 substances were judged to be rare allergens in epoxy resin systems (category “S”), and
- for 37 substances from the overall inventory a quantitative assessment with regard to frequency was not feasible (category “U”).

In addition, data from IVDK from year 2012 to 2015 have been assessed within the framework of this project. Within those 4 years 50,102 patients in total were tested epicutaneously in 56 dermatological departments. One epoxy resin based on bisphenol A diglycidyl ether (DGEBA) was tested in 85% of the patients within the standard test series. Thus, this testing was not done due to specific suspicion for some allergy from epoxy resins. The analysis of test responses for specific reactive diluents and amine based curing agents indicated, that between 18% and 28% of allergic reactions on reactive diluents and between 24 % and 78 % of the positive reactions on amine based curing agents were observed in patients, which were *not* sensitised to the DGEBA resin.

As it is not probable that those persons had been sensitised to the substances apart from their use in epoxy resin systems, this observation on curing agents and reactive diluents appears to be an interesting finding. Despite the overwhelming significance of allergies due to the resin, other components of the epoxy system may also justify a specific alert.

However, for the case of isophorondiamine it should be considered that sensitisation could well be due to exposure to isophoron diisocyanate. Therefore frequency of sensitisations from isophorondiamine in epoxy resin systems may be overestimated due to this additional source of sensitisation. Allergic reactions to a specific substance usually are due to exposure and sensitisation to just that substance. However, one has to consider that sensitisation may also be due to exposure to a chemically related similar substance. Person may react not only to the primary sensitiser but also to further chemically related substances (immunologic cross allergy reaction).

Epoxy Information System

Apart from scientific categorisation by the ranking method outlined above and apart from documenting human frequency data for allergies from epoxy resin systems, it was intended by the research project to also provide a tool to implement these results into practical workers’ protection from skin sensitising hazards. For this purpose it is proposed to establish an “epoxy information system” (EIS). This should be an internet platform, where various information relevant for practical occupational safety and health regarding epoxy resin systems can be found and which also includes a module, which can be used by the applicant to calculate sensitising potency scores quantitatively.

The suggested EIS consists of three parts:

- EIS substance list
- EIS module for calculating a hazard potency score for epoxy resin systems
- Practical EIS background information.

It is intended, to establish such an internet platform separately from this project and from what is documented within this report. But start up information for EIS is developed within the project. Later, EIS substance list, EIS mixture calculation module and EIS background information may be extended, updated and potentially be modified.

EIS substance list

EIS substance list represents an extended list characterising the single ingredient compounds of epoxy resin systems. Such extensions include

- additional substances, which may also be ingredients which are not linked to sensitising properties for discrimination and because of other health related relevant information,
- additional information to characterise the substance (identification, classification, work place exposure limit values, specific alert for carcinogens, reproductive toxicants, mutagenic substances, and properties that relate to skin corrosiveness, skin irritation or skin penetration),
- information on frequency of respective allergies (see section on human observations),
- information on potential environmental impact from classification or registries linked to environmental hazards (e.g., PBT properties etc.),
- usual ranges of content [mass %] within product formulation.

EIS module for epoxy resin mixture assessment

Within the framework of this project a methodology was developed and preliminary validated with few examples, which is very important to make use of single substance ranking of sensitising potency after transformation to the product level (epoxy resin formulation). As use in mixtures is the actual use pattern of substances from epoxy resin systems, this transformation is decisive for application of the ranking. No substitution of single substances can be requested or performed unless the consequences on the whole system are known and unless the system on the whole is assessed in an integrative way. Any comparative assessment also has to take into account that the alternative product has to be a technical substitute to the one which is compared.

The proposed method for the mixture assessment includes the following elements:

- the mixture receives a score which is a function of the single substance scores, which themselves are given by the potency category assigned to the single substance,
- concentration of the substance within the mixture [mass percentage] is also included when calculating the score,
- the formula also includes an amplification factor to address the situation where corrosive substances or skin permeability enhancers may increase sensitising potencies of a epoxy resin formulation,
- the calculation function corresponds to a (modified) additivity rule, if more than one sensitising substance occur in the mixture,
- finally, the hazard potency scores for the mixture have to be transformed into categories of similar potencies in order to apply a “banding approach”, as minor differences in score between similar alternatives may be meaningless from the viewpoint of substitution or comparative hazard assessment.

For “two component epoxy resin system” a stepwise procedure is suggested: firstly, a hazard potency score (GZ) is calculated for the single component (GZ for resin and for the curing agent each) and then the hazard potency score is transformed to represent to full product (taken into account the mixing ratio of, e.g., 3:1 or the like). The final decisive score is the one for the full mixture.

First example calculations demonstrated the feasibility of the approach and provided significant differences between the examined products with regard to overall sensitising potency.

EIS background information

The section “EIS background information” within EIS is assigned to provide further assistance to implement safer handling of epoxy resin systems. This information may, e.g., refer to

- appropriate interpretation of EIS substance list,
- discussion of other health related information beyond sensitisation that should be considered (e.g., information, if “bisphenol A” in epoxy resins is a distinct health problem apart of the sensitising property),
- appropriate interpretation of the calculated results from mixture aggregated assessments (EIS mixture module),
- opinions on specific assessment topics, like for aqueous epoxy resin emulsions or two component epoxy glues, readily available in general consumer markets for construction products
- technical and management options to avoid sensitisation from epoxy resin systems,
- hints to understand the mode of action of allergies by epoxy resins for concerned laymen,
- hints to learn about exposure and effects from air mediated contact skin sensitisers.

As an example within the framework of this project, an illustrative background information is provided to understand cross allergy from epoxy resin ingredients.

Conclusions and outlook

Results of this project provide sensitising potency categories of many sensitising ingredient substances of epoxy resin systems. Therefore hazard assessments may be performed and health parameters within substitution decisions may be assessed. Generally, it should not be expected that a (weak or strong) sensitiser can be substituted by another compounds with no such sensitising properties at all. However, it is expected that such substitution decisions may lead to some reduction in overall sensitising potency of the respective improved product. Selecting substances with lower sensitising potency, however, should never be an argument to reduce or not to maintain other technical and management measures to limit the chance for sensitisation from exposure to epoxy resin systems.

Beyond the assessment for sensitising potency for 66 substances, this report also represents a compendium with up to date analysis of the various testing methods on sensitising properties for any skin sensitising substance. The respective elaborations and the methodology for assessment are useful on a broader scale.

Assessment of the sensitising properties of epoxy resin ingredients within the framework of this project, however, was limited because of remaining significant data gaps for a substantial number of substances. Accordingly, category “U” (unknown potency) still

contains many substances. In addition, often only tendency categorisation was possible. It may be expected, that this situation may improve in future, a) because of the obligations to generate data from European chemicals' regulation (REACH) also for low tonnage substances, b) because of expected increased activities to validate and improve testing methods and *in silico* analyses with regard to sensitising potency of chemical substances. These improvements may also be triggered by further restrictions in permission of *in vivo* testing in future. Successful implementation of this projects' results also demands establishing the implementation of an epoxy information system EIS as is outlined in this project. This platform then needs to be established, extended, updated and maintained to provide users with useful occupational safety and health information.

Inhalt

Übersicht	3
Abstract	3
Zusammenfassung	5
Summary.....	15
Hintergrund	29
1 Arbeitsschritt 1: Überprüfung der gewählten Bewertungsmethodik	33
1.1 Hintergrund.....	33
1.2 Neuerungen im Bereich der Testmethoden zur Charakterisierung der sensibilisierenden Wirkstärke.....	36
1.2.1 <i>in vivo</i> Methoden	36
1.2.2 <i>in vitro</i> Methoden	38
1.2.3 <i>in silico</i> Methoden	57
1.3 Integrierte Teststrategien (ITS).....	60
1.3.1 Ansätze zur Bewertung des sensibilisierenden Potentials.....	64
1.3.2 Ansätze zur Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke	66
1.3.3 Fazit	68
1.4 Neue Ansätze für ein Ranking gemäß der sensibilisierenden Wirkstärke	69
1.4.1 Basketter et al. (2014): Ranking in 6 Kategorien auf Basis von Humandaten (NOAEL in HRIPT)	69
1.5 Fazit und Bewertungsschema mit aktualisierten Cut-off Werten	70
2 Arbeitsschritt 2: Ausdehnung der Substanzauswahl.....	74
2.1 Erweiterte Substanzauswahl anhand der Anregung aus dem Begleitkreis.....	74
2.2 Chemische Modifikationen der Komponenten von Epoxidharzen	75
2.3 Finale Neustoffliste für FP-0384	79
3 Arbeitsschritt 3: Erweiterte Datendokumentation zur sensibilisierenden Wirkung bei erweiterter Substanzauswahl	85
3.1 Allgemein	85
3.2 Aktualisierung der Datenlage zu bereits in FP-0324 bewerteten Substanzen	86
3.2.1 Epoxidharze	86
3.2.2 Härter, aromatische Amine	89

3.2.3	Härter, aliphatische Amine.....	90
3.2.4	Härter, cycloaliphatische Amine.....	98
3.2.5	Härter, sonstige	101
3.2.6	Säureanhydride.....	104
3.2.7	Sekundäre und tertiäre Amine	109
3.2.8	Phenole.....	109
3.2.9	Reaktivverdünner	110
3.3	Neue Substanzen: Datendokumentation für Einzelstoffe.....	121
3.3.1	N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin, Bis(aminopropyl)laurylamin, CASRN 2372-82-9.....	121
3.3.2	3-Aminopropyltriethoxysilan, CASRN 919-30-2	122
3.3.3	Bis[(dimethylamino)methyl]phenol, CASRN 71074-89-0	123
3.3.4	Propantriolglycidylether (1,2,3-Propanetriol, glycidyl ethers bzw. 1,2,3-Propanetriol, polymer with 2-(chloromethyl)oxirane), CASRN 90529-77-4 / 25038-04-4.....	124
3.3.5	N,N-Dimethyl-cyclohexanamin, CASRN 98-94-2	126
3.3.6	7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3- carboxylat, CASRN 2386-87-0.....	127
3.3.7	4,4'-Methylenbis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)anilin], 4,4'-Methylenebis(N,N-diglycidylanilin), TGMDA, CASRN 28768-32-3 ...	128
3.3.8	Epoxidharzmonomere (chemisch modifiziert)	129
3.3.9	Formaldehyd, Polymer mit Benzenamin, hydriert, CASRN 135108-88-2	131
3.3.10	Oligomerisierter Härter: 4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1- Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Aminomethyl-3,5,5- trimethylcyclohexylamin, CASRN 38294-64-3.....	132
3.3.11	1,3-Cyclohexylen-bis-methylamin, 1,3-Cyclohexanedimethanamin, CASRN 2579-20-6	133
3.3.12	Polyethylenpolytriethylentetramin, Amine, N-C12-18-alkyltrimethylendi-, diacetate, CASRN 90640-46-3	134
3.3.13	Epoxy-Emulsion.....	135
4	Arbeitsschritt 4: Zusätzliche <i>in vivo</i> Daten (human)	136
5	Arbeitsschritt 5: Zusätzliche <i>in vivo</i> (Tier) und <i>in vitro</i> Testungen	137
5.1	Vorgehen zur Festlegung der Testbatterie	137
5.1.1	DPRA.....	138
5.1.2	KeratinoSens™	138

5.1.3	LLNA (reduzierter Test)	140
5.2	Zusammenfassung der Ergebnisse	141
5.2.1	DPRA.....	141
5.2.2	KeratinoSens™	144
5.2.3	LLNA (reduzierter Test)	148
5.2.4	Fazit und Diskussion.....	151
6	Arbeitsschritt 6: Zusätzliche <i>in silico</i> Analyse.....	153
6.1.1	Ergebnisse.....	153
7	Arbeitsschritt 7: Aktualisiertes Ranking (Gesamtstoffliste)	157
7.1	Einzelstoffbewertung	157
7.1.1	Epoxidharze	157
7.1.2	Harze: Zusammenfassung und relative Bewertung.....	160
7.1.3	Härter, aromatische Amine	161
7.1.4	Härter, aliphatische Amine.....	161
7.1.5	Härter, cycloaliphatische Amine	172
7.1.6	Härter, sonstige	178
7.1.7	Säureanhydride.....	185
7.1.8	Sekundäre und tertiäre Amine	191
7.1.9	Phenole.....	193
7.1.10	Härter: Zusammenfassung und relative Bewertung.....	196
7.1.11	Reaktivverdünner	201
7.1.12	Reaktivverdünner: Zusammenfassung und relative Bewertung.....	221
7.2	Zusammenfassung allgemein	228
7.2.1	Datenlage	228
7.2.2	Verbesserte Datenverfügbarkeit über REACH 2013	229
7.2.3	Zusatzbewertung - Einstufungen.....	229
7.2.4	Bewertung der projektbezogenen <i>in vitro</i> Testung.....	230
7.2.5	Finale Bewertung durch FoBiG und IVDK (Vergleich).....	231
8	Vorgeschlagene Umsetzung der Projektergebnisse und Weiterführung durch das „Epoxidharz Informations System“ (EIS).....	237
8.1	Einführung.....	237
8.2	EIS- Stoffliste	238
8.3	EIS- Gemische	240

8.3.1	Fachlicher Hintergrund	240
8.3.2	Input-Daten	241
8.3.3	Berechnung der Gefährdungszahl	241
8.3.4	Bildung von Gefährdungsklassen	243
8.3.5	Beispiel	244
8.3.6	Diskussion	246
8.4	EIS- Hintergrund	246
8.4.1	Funktion und mögliche Themen	246
8.4.2	Kreuzallergien durch Komponenten von Epoxidharzsystemen	246
9	Dokumentation der Begleitkreisdiskussionen	255
9.1	Einführung.....	255
9.2	Begleitkreisprotokoll Sitzung am 9. September 2015.....	255
9.3	Begleitkreisprotokoll Sitzung am 15. Juni 2016.....	260
9.4	Begleitkreisprotokoll Sitzung am 7. November 2016.....	261
9.5	Mitglieder des Begleitkreises zum Projekt DGUV FP 0384.....	266
10	Literatur	268
	Glossar	284
	Anhang 1 – Zusätzliche Humandaten – IVDK-Daten (50 S.).....	288
	Anhang 2 – Zusätzliche Humandaten – Literaturstudie über allergologische Humanbefunde zu Inhaltsstoffen von Epoxidharzsystemen (112 S.).....	
	Anhang 3 – Studienberichte der projektspezifischen <i>in vitro</i> Testung im DPRA (326 S.)	
	Anhang 4 – Studienbericht der projektspezifischen <i>in vitro</i> Testung im KeratinoSens™ (32 S.)	
	Anhang 5 – Studienbericht der projektspezifischen Testung im LLNA (56 S.)	
	Anhang 6 – Eingangsdaten für die ITS-3 Modellierung (1 S.)	
	Anhang 7 – Übersicht der Ergebnisse aus ITS-3 Modellierung (1 S.)	

HINTERGRUND

Allergieverkrankungen durch berufliche Exposition gegenüber Epoxidharzsystemen gehören zu den häufigsten gesundheitlichen Risiken durch Chemikalien in der Arbeitswelt. Entsprechend ist es sinnvoll, Ersatzstoffe zu finden, die eine geringere Gefährdung hinsichtlich möglicher Allergieverkrankungen aufweisen. Da es aufgrund der hervorragenden technischen Eigenschaften von Epoxidharzen schwierig ist, diese Produktgruppe zu substituieren, ist es sinnvoll, innerhalb der Epoxidharzsysteme Stoffe mit möglichst geringem Sensibilisierungspotenzial einzusetzen. Dieser Hintergrund war Anlass eines Forschungsprojekts der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV-Projekt FP324 – Bewertung Epoxidharzsysteme), das im Dezember 2012 abgeschlossen wurde. Dort wurde die Problemstellung in ihrer Relevanz ausführlich dokumentiert und analysiert.

Bei diesem Projekt mussten jedoch relevante Begrenzungen in Kauf genommen werden:

- die Datenlage zu vielen Inhaltsstoffen von Epoxidharzsystem war begrenzt, so dass nur für etwa die Hälfte der bewerteten Inhaltsstoffe ausreichende Daten vorlagen, um eine differenzierte Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke durchzuführen, die (aus gesundheitlicher Sicht) eine Ersatzstoffentscheidung ermöglicht hätte,
- die finanzielle Ausstattung des Projekts ermöglichte zum damaligen Zeitpunkt nur sehr begrenzte experimentelle Testungen (*in vitro* Untersuchungen), da diese ursprünglich nicht vorgesehen waren; im dann refinanzierten Umfang erhielt die experimentelle Testung nur den Charakter einer Machbarkeitsstudie und konnte noch nicht umfangreich für Substanzbewertungen herangezogen werden.

Trotz dieser Begrenzungen zeigte bereits die im Jahre 2012 abgeschlossene Studie:

- die entwickelte und angewandte Methodik der Substanzbewertung bietet ein sinnvolles Bewertungsinstrument in der vergleichenden Stoffbewertung bei Epoxidharzsystemen,
- ein Nutzen ist dann gegeben, wenn das System eine vollständigere Bewertung von Epoxidharzinhaltsstoffen ermöglicht,
- der Ansatz ist auch in bisher nicht adressierten Anwendungen von Epoxidharzsystemen (Verantwortungsbereich anderer Berufsgenossenschaften) nutzbar,
- (auch deshalb) sind zusätzliche Stoffe nach dem Schema zu bewerten, die in dem ursprünglichen Vorhaben noch nicht betrachtet wurden.

Seit Abschluss des ersten Projekts hatten sich bis 2015 einige Voraussetzungen verändert und verbessert, die es sinnvoll erscheinen ließen, die ersten Ergebnisse aus dem ursprünglichen Vorhaben aufzugreifen, zu überprüfen und zu erweitern:

- Mit Registrierungstermin 2013 wurden zahlreiche Substanzen aus dem Tonnageband [100-1000 Jahrestonnen] unter REACH registriert; es ist nach den Registrierungsanforderungen zu erwarten, dass auf diese Weise weitere Informationen über Registrierungsdokumente verfügbar wurden, die bei dem Vorlaufervorhaben noch nicht vorlagen, unter anderem Informationen zur sensibilisierenden Wirkung/Allergie.
- Eine kursorische Prüfung der Literatur zeigte, dass auch außerhalb von REACH weitere Untersuchungen vorgenommen und publiziert wurden, die zur Schließung von Datenlücken geeignet sind.

- Die in dem abgeschlossenen Projekt eingesetzten Tests wurden inzwischen weiter validiert und durch zusätzliche Validierungsschritte bei anderen Tests ergänzt. Folglich war nun mit besserer Begründung die Basis gegeben, über diverse *in vitro* Untersuchungen die vergleichende Bewertung auszubauen bzw. mehr Substanzen einzubeziehen.
- Auch *in silico* Abschätzungen (Modellierung auf Basis von Struktureigenschaften von Chemikalien mit daraus abgeleiteter Vorhersage der Wirkstärke hinsichtlich der Gefährdungen durch Sensibilisierung) wurden zwischenzeitlich verbessert und waren bezüglich ihrer Eignung als Instrument für eine Plausibilitätsprüfung von Substitutionsempfehlungen zu untersuchen.
- In Literaturdatenbanken und bei Auswertungen des Informationsverbunds dermatologischer Kliniken (IVDK) konnten weitere Testergebnisse/ Erfahrungsberichte und Studien zu Humankollektiven am Arbeitsplatz mit Exposition gegenüber Inhaltsstoffen von Epoxidharzsystemen ermittelt werden, die auszuwerten waren.
- Relativ viele inzwischen publizierte methodische Arbeiten in der Literatur zum Wirkungsvergleich zwischen sensibilisierenden Stoffen ermöglichten nun eine verbesserte Einordnung des im Vorprojekt gewählten methodischen Ansatzes mit möglicher weiterer Optimierung oder ergänzenden Elementen.

Diese Rahmenbedingungen waren Grundlage für das hier vorgestellte Folgeprojekt „Gutachten zur vergleichenden gesundheitlichen Bewertung von Epoxidharzsystemen unter Berücksichtigung der sensibilisierenden Wirkstärke (FP-0384)“, das mit Projektbeginn zum 1. Mai 2015 beauftragt wurde.

Der Projektbericht folgt im Aufbau im Wesentlichen den Arbeitsschritten des Projekts und beinhaltet im Einzelnen:

- Überprüfung der gewählten Bewertungsmethodik (Abschnitt 1)
- Ausdehnung der Substanzauswahl (Abschnitt 2)
- Erweiterte Datendokumentation zur sensibilisierenden Wirkung für die erweiterte Substanzauswahl (Abschnitt 3)
- (im Rahmen des Projekts generierte) zusätzliche *in vivo* Daten (Abschnitt 4)
- (im Rahmen des Projekts generierte) zusätzliche *in vitro* Daten (Abschnitt 5)
- (im Rahmen des Projekts durchgeführte) zusätzliche *in silico* Analyse (Abschnitt 6)
- Aktualisiertes Ranking mit Einzelstoffbewertung und übergreifender Einordnung (Abschnitt 7)
- Vorgeschlagene Umsetzung der Projektergebnisse und Weiterführung durch das „Epoxidharz Informations System (EIS)“ (Abschnitt 8)
- Dokumentation der Begleitkreisdiskussionen (Abschnitt 9)
- Diskussion (Einordnung der Ergebnisse und Ausblick; Abschnitt 10).

Der Bericht enthält ferner Anhänge mit Humandaten aus der Erfassung des Informationsverbunds Dermatologischer Kliniken (IVDK) im Rahmen dieses Projekts (ANHANG 1), mit Literaturdaten, die ebenfalls vom IVDK zu der erweiterten Stoffliste recherchiert wurden (ANHANG 2), den detaillierten Studienberichten der im Projekt durchgeführten Testung (Anhänge 3 – 5) und mit den Eingangsdaten und den Ergebnissen einer integrierten *in silico* Analyse (ANHÄNGE 6, 7).

Die Beauftragung für dieses Projekt erfolgte durch die Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV) und wurde zudem finanziell maßgeblich durch die DEUTSCHE

BAUCHEMIE e.V., Frankfurt am Main, durch PlasticsEurope, Brüssel, und durch die Allgemeine Unfallversicherungsanstalt (AUVA), Wien, unterstützt. Die Autoren dieses Berichts danken den genannten Institutionen für die Förderung des Vorhabens.

Es ist uns ein zusätzliches Anliegen, dem Begleitkreis des Projektes (Zusammensetzung vgl. Abschnitt 9.5) für die Benennung relevanter Epoxidharzinhaltsstoffe und die konstruktiven Diskussionen während der Bearbeitung zu danken. Testmaterial erhielten wir freundlicherweise kostenfrei von Fa. Almirall Hermal GmbH, CTP Chemicals and Technologies for Polymers GmbH, Evonik Industries AG, MC-Bauchemie Müller GmbH & Co. KG und STAUF Klebstoffwerk GmbH.

Besonders hilfreich waren die Modellierungen, die von Frau Dr. Joanna Jaworska, Procter & Gamble, Brüssel, beigetragen und von uns eingeordnet wurden (vgl. Abschnitt 6 und ANHÄNGE 6, 7). Ferner sind die Laborarbeiten (*in vivo* und *in vitro* Testungen) maßgeblich gewesen, um das Projektziel zu erreichen (A. Natsch (Givaudan, Schweiz, J. Hargitai und D. Esdaile (CiToxLab, Hungary), sowie S. Kolle und B. Wareing (BASF); vgl. 5). Auch hierfür sehr herzlichen Dank.

Fritz Kalberlah, FoBiG

Martin Hassauer, FoBiG

Karin Heine, FoBiG

Johannes Geier, IVDK

Holger Lessmann, IVDK

Freiburg, 6. Dezember 2016

1 ARBEITSSCHRITT 1: ÜBERPRÜFUNG DER GEWÄHLTEN BEWERTUNGSMETHODIK

1.1 Hintergrund

Die im Vorläuferprojekt (FP-0324; Heine et al., 2012) bereits vorgestellten mechanistischen Grundlagen der Entwicklung einer Kontaktdermatitis wurden von der OECD nochmals bestätigt und als sogenannter „Adverse outcome pathway“ (AOP) veröffentlicht (OECD, 2012a; b). Ein AOP beschreibt allgemein eine nötige Abfolge von Ereignissen („key events“, KEs), die eine Chemikalie auslösen muss, um zu einem bestimmten adversen Effekt zu führen. Dabei startet ein AOP immer mit einem auf molekularer Ebene initiierendem Ereignis („molecular initiating event“, MIE = KE1). Anschließend folgen Schlüsselereignisse (KEs) auf zellulärer, Organ- und Organismusebene.

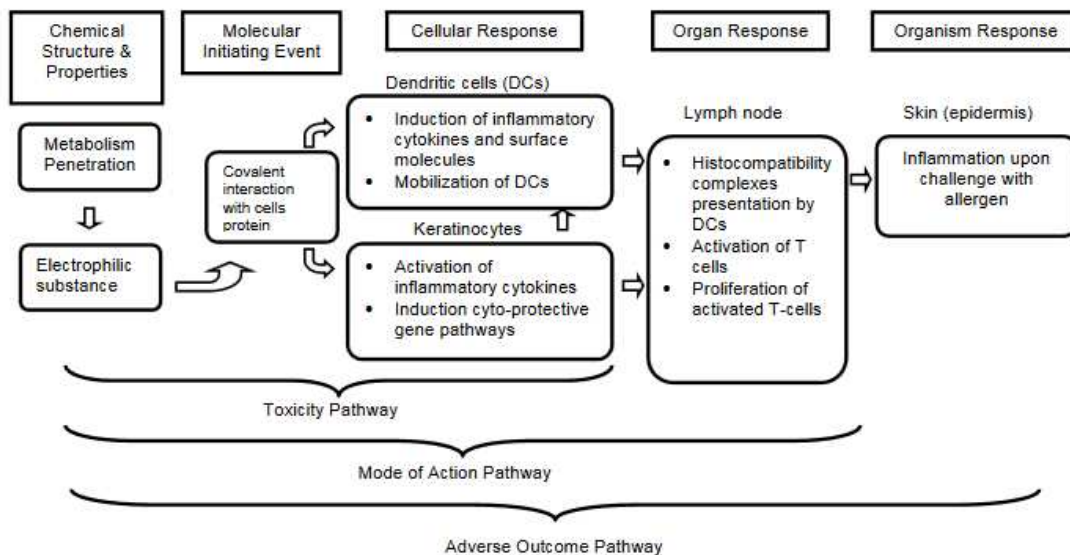


Abbildung 1 Flussdiagramm zum Ablauf der mechanistisch notwendigen Schritte für die Entstehung einer Kontaktdermatitis (Abbildung entnommen aus OECD, 2012a)

Als KE definiert sind nach (OECD, 2012a; b) folgende vier Schritte:

- KE1 – Haptenisierung (Proteinreaktion)
- KE2 – Keratinozytenreaktion (Entzündungsmediatoren)
- KE3 – Reifung und Migration der dendritischen Zellen
- KE4 – T-Zellaktivierung/ Proliferation allergenspezifischer T-Zellen

In der Beschreibung in FP-0324 wurde neben diesen vier KEs als erster Schritt noch die Hautpenetration/Bioverfügbarkeit genannt. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, wird jedoch die Bioverfügbarkeit im AOP ebenfalls betrachtet, sodass sich letztlich nur eine leichte Verschiebung in der Gewichtung der Ereignisse und der Nummerierung ergibt, die jedoch auf die Gesamtbewertung im vorliegenden Projekt keinen Einfluss nimmt.

Auf Basis dieser generellen Grundlage wurden im Vorläuferprojekt vorhandene Ansätze zur Charakterisierung der sensibilisierenden Wirkstärke identifiziert und auf ihre Eignung überprüft. Ausgehend von den Einzelmethoden wurde eine geeignete Methodik für ein wissenschaftlich qualifiziertes und praxisnahes Ranking von Komponenten in Epoxidharzsystemen entwickelt (siehe Abbildung 2) und angewandt.

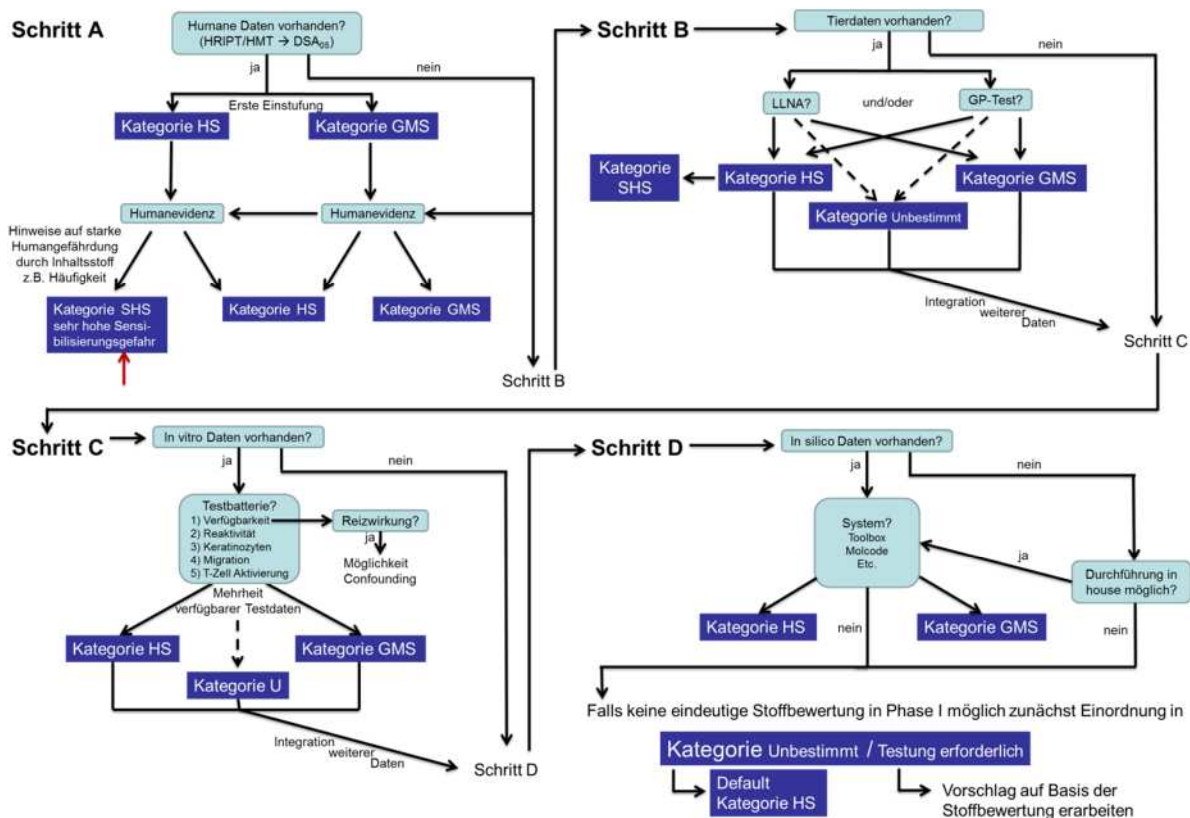



Abbildung 2 **Stufenweise Gesamtbewertung der sensibilisierenden Wirkstärke einer Substanz. Schritt A: Humandaten, Schritt B: *in vivo* Daten (Tierversuche), Schritt C: *in vitro* Daten, Schritt D: *in silico* Daten**

Das prinzipielle Vorgehen im Sinne einer „Weight of evidence“ (WoE) Betrachtung findet sich mittlerweile auch in anderen Bewertungen der sensibilisierenden Eigenschaften (z.B. OECD, 2012b, Anhang 1 (qualitativ))¹. Am Schluss einer jeden Bewertung wird jede Substanz im vorliegenden Projekt in eine der folgenden Kategorien eingeordnet (siehe Abbildung 3)



Kürzel	Kategorie	Definition
SHS	Sehr hohe Sensibilisierungsstärke (S)	Sehr hohe S im Tierversuch und/oder sehr hohe Humanevidenz*
HS (Default)	Hohe Sensibilisierungsstärke	WoE hohe S oder Unbekannt (Defaultvorgehen bei zu wenig Daten)
GMS	Geringe bis mäßige Sensibilisierungsstärke	WoE geringe bis mäßige S und/oder geringe Humanevidenz

Abbildung 3 **Drei Kategorien zur Einstufung der Inhaltsstoffe von Epoxidharzsystemen gemäß ihrer sensibilisierenden Wirkstärke**

* Unter Humanevidenz wird im vorliegenden Bericht nicht nur der klare Beweis einer Humansensibilisierung verstanden, sondern auch zusätzlich versucht, die quantitative Wirkung eines Inhaltsstoffes einzubeziehen.

S: Sensibilisierungsstärke; WoE: weight of evidence, Ansatz zur gewichteten Bewertung verschiedener Daten

Seit dem Abschluss des Vorläuferprojekts haben sich viele Neuerungen ergeben, so wurden beispielsweise verschiedenen Testmethoden validiert, bestehende Testmethoden weiterentwickelt oder neue Ansätze für die Charakterisierung der sensibilisierenden Wirkstärke veröffentlicht. Im Folgenden werden die relevanten Neuerungen im Bereich der Testmethoden zur Charakterisierung der sensibilisierenden Wirkstärke kurz dargestellt und diskutiert. Es erfolgt eine Unterteilung nach

- *in vivo* Methoden (nur Tierdaten),
- *in vitro* Methoden unter Berücksichtigung der Teilschritte („key elements“, KE), die von einer Substanz durchlaufen werden müssen, um sensibilisierend zu wirken ,
- *in silico* Methoden — sowie übergreifenden
- integrierten Teststrategien (ITS) und Rankingansätzen anderer Autoren.

¹ Guidance on information requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R.7a: Endpoint specific guidance, Draft version 5.0, June 2016; Full revision Section R.7.3 Skin and Respiratory sensitisation. <http://echa.europa.eu/support/guidance/consultation-procedure/ongoing-reach>

1.2 Neuerungen im Bereich der Testmethoden zur Charakterisierung der sensibilisierenden Wirkstärke

Dieses Kapitel stellt die Aktualisierung und Erweiterung um neue vielversprechende Methoden Teilprojekt 5.1 „Beschreibung von Ansätzen zur Charakterisierung der sensibilisierenden Wirkstärke und Prüfung von deren Eignung“ aus dem Vorgängerprojekt FP-0324 dar. Die Grundlage dieses Kapitels bildet eine systematische Datenrecherche (Details siehe Abschnitt 3.1; Recherchezeitraum 2013 – Juni 2015). Teilweise werden die zum Zeitpunkt der Berichtserstellung neuesten Publikationen zitiert, es wird jedoch kein Anspruch auf Vollständigkeit der Daten nach Juni 2015 erhoben.

1.2.1 *in vivo* Methoden

Der klassische lokale Lymphknoten Test in Mäusen (LLNA; Detailbeschreibung siehe Vorgängerprojekt FP-0324) stellt immer noch den Goldstandard zur Wirkstärkenbeurteilung dar.

In einer aktuellen Zusammenschau („Draft guidance IR&CSA R.7a“, Juni 2016) werden folgende (oft bereits bekannte) Limitierungen genannt:

- Der LLNA ist für einige Metalle ungeeignet (falsch negative Prognosen, z.B. Nickel).
- Falsch positive Vorhersagen erhält man für bestimmte oberflächenaktive Substanzen oder Siloxane.
- Bei Substanzen mit geringer Löslichkeit kann die Treffgenauigkeit („accuracy“) des Tests beeinträchtigt sein.
- Die Wahl des Lösemittels vermag es das Testergebnis für bestimmte Stoffe zu beeinflussen (z. B. DMSO als ein polares Lösungsmittel, kann die dermale Bioverfügbarkeit einiger Testsubstanzen verbessern und Propylenglykol kann die proliferative Wirkung von einigen Testsubstanzen (z.B. DNCB) unterdrücken). Daher ist die richtige Wahl des Lösemittels zentral.

Eine aktuelle Publikationsreihe beschäftigt sich zudem mit den zu Grunde liegenden Mechanismen und Annahmen des LLNA, welche eine korrekte Wirkstärkenbewertung beeinflussen können (mechanistische Betrachtungen, Variabilität des LLNA, Schlussfolgerungen bei unterschiedlichen Ergebnissen aus LLNA im Vergleich mit GPMT/HRIPT; Roberts et al., 2016a; 2016b; 2016c).

1.2.1.1 LLNA mit Analyse der Genexpression (Adenuga et al., 2012)

Die Autoren untersuchten im Rahmen der Durchführung eines klassischen LLNA auch die Genexpression in den Lymphknoten. Es wurden 6 Testsubstanzen (nicht relevant im Bezug auf Epoxidharzsysteme) getestet (Haut- und Atemwegs-Sensibilisierer, reizende, aber nicht sensibilisierende Substanzen). Bei zahlreichen Genen zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg in Abhängigkeit vom Wirkungsprofil. Es war sowohl eine Unterscheidung zwischen Haut- und Atemwegs-Sensibilisierern und auch zwischen reizenden, aber nicht sensibilisierenden Substanzen möglich (Adenuga et al., 2012). Wegen der hohen Komplexität und der fehlenden Validierung kommt dieser Test nicht für eine Verwendung im Rahmen dieses Projekts in Frage.

1.2.1.2 LLNA mit Immunophänotypisierung (Strauss et al., 2015)

Strauss et al. (2015) untersuchten, ob eine immunologische Charakterisierung der Lymphknotenzellen eine verbesserte Aussage zu sensibilisierenden und/oder reizenden Eigenschaften einer Substanz ermöglicht. Dazu wurden Zellsuspensionen mittels spezifischer Antikörper auf immunologische Oberflächenmarker (z.B. CD19, CD3, CD4) durchflusszytometrisch untersucht. Es zeigte sich, dass mit diesen verwendeten Oberflächenmarkern nicht zwischen sensibilisierenden und/oder reizenden Substanzen unterschieden werden konnte.

1.2.1.3 modifizierter rLLNA (Roberts, 2015)

Zur Reduktion des Verbrauchs von Versuchstieren wurde ein reduzierter LLNA (rLLNA) konzipiert, bei dem nur eine Dosis getestet wird, welche der höchsten bislang getesteten Dosis entsprach (siehe z.B. Ezendam et al., 2013). Dieser Test wurde bereits in die OECD Testvorschrift für den klassischen LLNA aufgenommen (OECD, 2010b), erlaubt aber keine Potenzaussage. Roberts (2015) modifizierte die Auswertung dieses rLLNA, so dass mittels einer Probitfunktion trotz der Testung nur mit einer Dosis EC3 Werte abgeleitet werden können. Diese Funktion wurde aus Daten klassischer LLNA generiert. Im modifizierten rLLNA werden die Stimulationsindices (SI) bei 10 % Testsubstanz bestimmt (ggf. geringer bei reizenden Substanzen) und entsprechend die EC3 Werte errechnet, wobei bei einem cut-off von SI 1,8 maximal EC3 Werte von 26 % erreicht werden können. Substanzen mit einem SI < 1,8 (z.B. Butylglycidylether in diesem Test) müssen nochmals bei höheren Konzentrationen getestet werden. Die EC3-Werte des modifizierten rLLNA zeigten eine gute Übereinstimmung mit denen des klassischen LLNA (maximale Abweichung ca. Faktor 3). In den aktuellen Empfehlungen der ECHA wird jedoch darauf hingewiesen, dass eine solche Wirkstärkenbeurteilung noch vorläufig ist und der rLLNA nur verwendet werden sollte, um ein erwartet negatives Ergebnis zu verifizieren („Draft guidance IR&CSA R.7a“, Juni 2016).

1.2.1.4 Lymph Node Cell Count Assay (Basketter et al., 2012; Ehling et al., 2005)

Als Variante des LLNA ohne Einsatz radioaktiver Reagenzien favorisieren Basketter et al (2012) den LNCC (Lymph Node Cell Count) Assay, welcher bereits von Ehling et al. (2005) etabliert wurde (inkl. eines Interlaborvergleichs und eines Vorhersagemodells). Dabei wird statt der Stimulationsindices nach 3H-Thymidineinbau beim klassischen LLNA der Anstieg der Zellzahlen in den Lymphknoten bestimmt. Nach dem Vorhersagemodell wird eine Substanz als positiv angesehen, wenn ein signifikanter Anstieg der Zellzahlen oder ein Stimulationsindex von > 1,5 beobachtet wird. Bei einem parallelen Anstieg des Ohrgewichtes > 1,2 muss von reizender Wirkung ausgegangen werden, und die Vorhersage der hautsensibilisierenden Wirkung ist unsicher. Die prinzipiellen Vor- und Nachteile sowie die Anwendungsdomäne des LLNA gelten auch für den LNCC. In Analogie zum LLNA wird von den Autoren vorgeschlagen, Substanzen mit einer EC1,5

- < 0,1 % als extrem sensibilisierend
 - von ≥ 0,1 bis < 1 % als stark,
 - von ≥ 1 bis < 10 % als mittelstark, und von
 - ≥ 10 % als schwache Sensibilisierer
- anzusehen.

Von Basketter et al. (2012) wurden 22 Substanzen (performance standards nach ECVAM) mit dem LNCC getestet. Die Ergebnisse des LNCC stimmten bei 21 Substanzen mit dem LLNA überein (95 % korrekt). Kollé et al. (2012) führten eine erweiterte vergleichende Testung von LLNA und LNCC von insgesamt 180 Substanzen durch (Chemikalien, kommerzielle Produkte und Agrochemikalien). Es ergab sich eine Übereinstimmung der qualitativen Bewertung bei 154 Substanzen (86 %). Die unterschiedlich bewerteten Stoffe hatten jeweils EC Werte nahe dem Schwellenwert des jeweiligen Vorhersagemodells, d.h. es handelte sich um grenzwertige Resultate. Die Autoren sehen den LNCC als eine gute nichtradioaktive Alternative zum LLNA. Dies wird in einer weiteren Publikation generell bestätigt und die Rolle der „performance standards“ bei der Entwicklung von Alternativmethoden diskutiert (Kollé et al., 2013).

1.2.1.5 Fazit

Im vorliegenden Projekt wurden für fünf Substanzen LLNA Testungen durchgeführt, die eine Einordnung in die zwei unterschiedlichen Wirkstärkekategorien HS und GMS ermöglichen sollen. Details der projektspezifischen Testung sind im Kapitel 1375 gezeigt und diskutiert.

Wurden im Projekt zu bewertende Inhaltsstoffe von Epoxidharzgemischen in einem *in vivo* Standardtests (siehe FP-0324) oder den hier neu beschriebenen modifizierten Lymphknotentests getestet und die Ergebnisse in der Literatur veröffentlicht, so wurden die Ergebnisse substanzspezifisch dokumentiert. Die Ergebnisse wurden in die jeweilige Gesamtbewertung eingeschlossen, gerade bei den modifizierten Lymphknotentests fehlen jedoch noch qualifizierte cut-off Werte für eine Einordnung in die Kategorie HS oder GMS.

1.2.2 *in vitro* Methoden

Die generellen Beschränkungen von *in vitro* Testmethoden, wie sie bereits im Vorgängerprojekt erwähnt wurden, gelten auch weiterhin.

Einige neuere Publikationen zielen auf eine Verbesserung der Methodik. So empfiehlt beispielsweise Dimitrov und Kollegen (2016) eine Methodik, um die Gefahr der Übernahme für den Menschen falscher Annahmen bezüglich der sensibilisierenden Eigenschaften einer Substanz auf Basis der Validierung der *in vitro* Testmethoden gegenüber Ergebnissen aus dem LLNA zu verringern. Dumont et al. (2016) beschäftigen sich ebenfalls mit der Variabilität der in den Validierungen zugrunde gelegten LLNA Daten und beschreiben, dass beispielsweise bei Testung einer Chemikalie in mehr als einem Vehikel im LLNA die Übereinstimmung der Ergebnisse schlechter wird, zudem sind die Ergebnisse bei Chemikalien, die als extrem sensibilisierend betrachtet werden, konstanter als solche, die schwach sensibilisierend sind. Ähnliche Effekte werden auch in weiteren Publikationen beschrieben (Hoffmann, 2015; Kollé et al., 2013; Roberts et al., 2016a).

Eine Publikation behandelt die (teilweise) fehlende metabolische Kapazität von *in chemico* Tests und zellulären Systemen (untersucht wurden der Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA), der Keratinozytenaktivierungstest KeratinoSens™, und der Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)). 127 Substanzen, für die Ergebnisse aus allen drei Tests, sowie dem LLNA vorlagen, wurden analysiert. 28 Substanzen benötigen zur Auslösung einer Sensibilisierungsreaktion eine Aktivierung (12 eindeutige Prehaptene, 9 Substanzen unklar, ob Pre- oder Prohaptene). Alle wurden in mindestens einem der Alternativtests richtig identifiziert. Die beste Vorhersage für Prehaptene erfolgte durch den DPRA, die beste

Vorhersage für Prohaptene lieferte der h-CLAT. Die von den Autoren daraus abgeleitete Schlussfolgerung lautet, dass die limitierte metabolische Kapazität der Testsysteme einer korrekten Vorhersage der untersuchten Substanzen nicht im Wege steht (Patlewicz et al., 2016). In einem anderen Bericht derselben Untersuchung wird zudem nahe gelegt, dass negative Ergebnisse aus *in vitro* Daten generell akzeptiert werden sollten, außer es liegen Hinweise vor, dass eine Substanz nur über eine metabolische Aktivierung als hautsensibilisierend wirkt. Solche Argumente könnten *in silico* Werkzeuge wie die QSAR Toolbox oder TIMES-SS liefern (Casati et al., 2016).

1.2.2.1 Bioverfügbarkeit/Hautdurchdringung

1.2.2.1.1 Allgemein

Jung und Maibach (2015) verglichen die Eigenschaften verschiedener *in vivo* und *ex vivo* Modelle zur Hautpenetration im Hinblick auf eine Vergleichbarkeit zur Durchdringung der menschlichen Haut. Es zeigte sich, dass bei Ratten- und Kaninchenhaut im Allgemeinen eine höhere Absorption als bei menschlicher Haute beobachtet wurde, bei Schwein, Affe und haarlosen Meerschweinchen ergab sich eine bessere Übereinstimmung. Nachdem eine Verwendung dieser Modellsysteme im Rahmen dieses Projektes nicht erfolgen kann, werden die Befunde hier nicht weiter diskutiert.

Eine Analyse der vorhandenen Daten aus den REACH-Registrierungsdossiers zum Molekulargewicht und dem Verteilungskoeffizienten $\log K_{O/W}$ in Zusammenhang mit den sensibilisierenden Substanzeigenschaften (Analyse von 2900 Substanzen, davon hatten 200 Substanzen ein MW > 500 Da → davon 33 hautsensibilisierende Substanzen) besagt, dass womöglich die Hautpenetration für die Bestimmung der sensibilisierenden Substanzeigenschaften und Wirkstärke nicht als relevanter Parameter anzusehen sei (Fitzpatrick et al., 2017a; b). Auch die Analyse der REACH Daten durch Luechtefeld (Luechtefeld et al., 2016) weist darauf hin, dass der oft zitierte cut-off Wert von 500 Da für hautsensibilisierende Substanzen nicht ausreicht, um eine mögliche hautsensibilisierende Eigenschaft auszuschließen (1255 Substanzen als sensibilisierend eingestuft, davon 49 mit einem MW von > 500 Da). Auch ein anderer Autor stellt durch Daten den cut-off Wert von 500 Da in Frage, lässt jedoch offen, ob ein möglicher cut-off Wert bei circa 600 Da existiert (Roberts et al., 2012). Eine andere Quelle nennt einen Wert von 800 Da (Ezendam et al., 2016). Zudem verweist Roberts et al. auf die Tatsache, dass die sensibilisierende Wirkstärke nicht gänzlich unabhängig vom MW ist, da bei größeren Molekülen weniger Moleküle pro aufgetragener Menge auf der immer gleich bleibenden Hautprobenfläche vorhanden sind (Roberts et al., 2012). Alves et al. (2015) berichten, dass die Hautpenetration und die sensibilisierende Wirkung keine gute Übereinstimmung zeigen, jedoch sollte die Information nicht gänzlich vernachlässigt werden (Maxwell et al., 2014). Die wissenschaftliche Diskussion muss an dieser Stelle weiterverfolgt werden. Insgesamt stellt dies jedoch keine Veränderung zu der im Projekt angewandten Rankingmethodik dar, da die Hinweise auf Basis des Verteilungskoeffizienten und des Molekulargewichts bisher nur qualitativ einfließen.

1.2.2.1.2 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

Wie bereits im Vorgängerprojekt beschrieben, kann der Oktanol-Wasser- Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$; englisch: logP, partition constant, partition ratio, distribution ratio) als einfaches Maß für die Bioverfügbarkeit einer Substanz herangezogen werden. Im

Vorläuferprojekt wurde der $\log K_{O/W}$ mithilfe der EPI Suite™ (Estimation Programs Interface Suite™; EPIWEB 4.0; US EPA) aus dem Modell KOWWIN v1.67 berechnet. Aktuell liegt die Modellversion KOWWIN v1.68 vor, welche außer in der EPI Suite™ ebenfalls in der QSAR Toolbox (OECD, 2016b) implementiert ist. Für die Substanzen aus dem Vorgängerprojekt wurden die bereits ermittelten Werte weiterverwendet und nur für die neuen Substanzen eine Bestimmung mittels CASRN oder SMILES Code innerhalb der Toolbox durchgeführt.

1.2.2.1.3 Berechnung Permeabilitätskoeffizient (K_p)

Anhand von wenigen Eingangsgrößen – wie dem Molekulargewicht und dem Oktanol–Wasser–Verteilungskoeffizienten ($\log K_{O/W}$) – kann der dermale Permeabilitätskoeffizient (K_p) errechnet werden. Die Berechnung kann händisch (siehe Versuchsvorschrift in FP-0324) oder automatisiert mit Hilfe des Programms DERMWIN aus der frei verfügbaren EPI Suite™ der US EPA erfolgen. Im Vorgängerprojekt wurde die DERMWIN v.1.43a (September 2008) verwendet, mittlerweile steht die v2.02 (September 2012) zur Verfügung.

1.2.2.1.4 3D Hautmodelle – speziell: epiCS® (früher EST–1000™)

Die Hilfe von sog. „3D reconstructed skin models“ oder „3D reconstructed human epidermal (RHE) models“, die die biochemischen und physiologischen Eigenschaften der oberen Hautschichten (d.h. der Epidermis) nachbilden, wird von verschiedenen Autoren in Anspruch genommen.

Innerhalb des EU FP 6 geförderten Sens-it-iv Projekts wurde unter anderem das Epidermis Äquivalenzmodell („epidermal equivalent“; EE–Kultur) epiCS®, vertrieben von der der CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, entwickelt und in eine Standardarbeitsanweisung (SOP) integriert (dos Santos et al., 2011). Ableseparameter sind die etablierte EE-EC₅₀ (Konzentration, die die Anzahl lebender Zellen der humanen EE–Kultur um 50% reduziert) und IL-1 α _{2x} (Konzentration, die zur Induktion einer 2fach erhöhten IL-1 α Sekretion benötigt wird). Erste Ergebnisse der laufenden Validierung liegen vor (Teunis et al., 2014). Im Ringversuch wurden zwei Vorhersagemodelle etabliert.

1) EE-EC₅₀ < 7 mg/mL entspricht einem stark oder extrem stark sensibilisierenden Agens im LLNA, EE-EC₅₀ ≥ 7 mg/mL entspricht einem schwach oder moderat sensibilisierenden Agens im LLNA;

2) Kombination aus EE-EC₅₀ und IL-1 α _{2x}.

Für das erste Vorhersagemodell wurde über alle Labore eine „accuracy“ von 77 % erzielt. Ergebnisse für das zweite Vorhersagemodell sind nicht berichtet.

Wie bereits beschrieben, kann im EE-Test nur die Wirkstärke bekannter sensibilisierender Stoffe beurteilt werden kann und nicht generell das sensibilisierende Potential einer Substanz. Als Nachteil gilt außerdem, dass negative Ergebnisse (d.h. keine Reduktion der lebenden Zellen um 50 % bis hin zur maximalen Testkonzentration (200 mg/mL)) nicht gewertet werden können. Wenn keine Löslichkeitsprobleme vorliegen, könnte man ggfs. von einem schwach sensibilisierenden Agens ausgehen, es ist jedoch nicht mit Sicherheit auszuschließen, dass die Testchemikalie nicht in/durch das Stratum corneum dringen konnte und eine Aussage zur sensibilisierenden Wirkstärke aus diesem Grund nicht machbar ist (Teunis et al., 2014).

Die Weiterentwicklung des Tests und die Fortschritte der Validierung des EE-Tests in Kombination mit dem NCTC2544 IL-18-Test zur Wirkstärkenbeurteilung werden in 1.2.2.3.1 beschrieben.

1.2.2.2 Haptenisierung

1.2.2.2.1 Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA; OECD TG 442C)

Der bereits in FP-0324 beschriebene DPRA ist mittlerweile validiert. Es liegt eine ECVAM Empfehlung inkl. Validierungsstudie (EC, 2013) sowie eine OECD Testing Guideline (TG) vor (OECD, 2015a). Laut TG 442C kann der Test bei positivem Ergebnis zur Einstufung als SkinSens Cat 1 (nach UN GHS (United Nations, 2013)) genutzt werden, um eine Einstufung als „Non-Sensitiser“ zu erreichen, muss der Test Teil einer Integrierten Teststrategie sein (siehe auch 1.3). Das bereits in FP-0324 vorgestellte Testprinzip bleibt bestehen, ebenso wie die generellen Nachteile dieses Tests (z.B. Reaktivität nur gegenüber Lysin und Cystein, fehlende metabolische Aktivierung im zellfreien System (Pro-Haptene), fehlende abiotische Transformation (Pre-Haptene), Peptidreaktivität unterscheidet sich von realer Proteinreaktivität).

Zusätzlich wurden Hinweise zur Anwendungsdomäne, Akzeptanzkriterien für Experimente, und weitere Limitierungen genannt, sowie ein Vorhersagemodell zur Einstufung (siehe Tabelle 1) ausgewiesen. Die zusätzliche Information aus der Testrichtlinie und der aktualisierten Entwurfsfassung der endpunktspezifischen Leitlinie der ECHA („Draft guidance IR&CSA R.7a“, Juni 2016) wird im Folgenden kurz zusammengefasst:

- Für metallische Verbindungen ist der Test nach TG 442C nicht geeignet.
- Die zu testende Chemikalie sollte bis zur finalen Konzentration von 100 mM im entsprechenden Lösemittel gelöst vorliegen. Chemikalien, die nicht bis zur höchsten geforderten Konzentration löslich sind, können bis hin zur höchsten Löslichkeitskonzentration getestet werden. Ein positives Testergebnis kann zur Bestätigung einer hautsensibilisierenden Chemikalie genutzt werden. Bei einem negativen Ergebnis kann keine endgültige Schlussfolgerung bezüglich der Reaktivität gezogen werden.
- Aufgrund der definierten einzusetzenden Molverhältnisse zwischen Testchemikalie und Peptid kann für komplexe Gemische (z.B. UVCB Substanzen) anhand des aktuellen Vorhersagemodells (prediction model) keine Angabe gemacht werden.
- Es können falsch negative Testergebnisse erzielt werden, wenn Substanzen getestet werden, die ausschließlich mit anderen Aminosäuren als Cystein oder Lysin (z.B. nukleophile Histidine) interagieren.
- Bei Substanzen, die zwar nicht kovalent an die Peptide binden, aber die Oxidation dieser fördern, kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen (Überschätzung z.B. bei Cystein Dimerisierung).

Tabelle 1 Vorhersagemodelle entnommen aus der OECD Testing Guideline 442C
 a) Vorhersage anhand der mittleren Peptiddepletion [%] aus dem Versuchsansatz mit Cystein und Lysin
 b) Vorhersage anhand der Peptiddepletion [%] aus dem Versuchsansatz mit Cystein alleine

a)

Mean of cysteine and lysine % depletion	Reactivity Class	DPRA Prediction
$0\% \leq \text{mean \% depletion} \leq 6.38\%$	No or minimal reactivity	Negative
$6.38\% < \text{mean \% depletion} \leq 22.62\%$	Low reactivity	Positive
$22.62\% < \text{mean \% depletion} \leq 42.47\%$	Moderate reactivity	
$42.47\% < \text{mean \% depletion} \leq 100\%$	High reactivity	

b)

Cysteine (Cys) % depletion	Reactivity class	DPRA prediction
$0\% \leq \text{Cys \% depletion} \leq 13.89\%$	No or minimal reactivity	Negative
$13.89\% < \text{Cys \% depletion} \leq 23.09\%$	Low reactivity	Positive
$23.09\% < \text{Cys \% depletion} \leq 98.24\%$	Moderate reactivity	
$98.24\% < \text{Cys \% depletion} \leq 100\%$	High reactivity	

Die oben präsentierten Vorhersagemodelle führen nicht zu einem Aktualisierungsbedarf der Cut-off Werte des in FP-0324 entwickelten Bewertungssystems (siehe 1.5).

Eine Wirkstärkenbetrachtung anhand dieser Reaktivitätswerte ist nicht möglich - da wie bereits im Vorgängerprojekt beschrieben - nicht „das Ausmaß der Peptidreaktivität maßgeblich für die sensibilisierende Wirkstärke einer Substanz“ ist, „sondern eher die Proteinbindungsstelle“. In der Versuchsvorschrift wird jedoch auf die Integrierten Teststrategien (ITS) aus Jaworska et al. (Jaworska et al., 2013; Jaworska et al., 2015) verwiesen, in dem die DPRA Ergebnisse zur Wirkstärkenbewertung herangezogen werden (siehe auch 1.3 und 6). Auch andere Autoren verwenden diesen Test in ITS (siehe Abschnitt 1.3).

Natsch et al. (2013) quantifizierten das Ausmaß der Peptid-Depletion in Bezug auf die Wirkstärke (quantitatives Vorhersagemodell, in Übereinstimmung mit der OECD Guideline 442C): ein mittlerer Wert aus Cystein- und Lysin-depletion zwischen 6,37 % (dem Schwellenwert für positive Wirkung) und $\leq 22,26$ % steht demnach für geringe Reaktivität, zwischen 22,62 und $\leq 42,47$ % für mittelstarke und ab Werten von 42,47 % für hohe Reaktivität.

Durch Urbisch et al. (2015) wurden ca. 200 Substanzen unterschiedlicher Struktur getestet (Acylierer, Michael Akzeptoren, Chinonvorläufer, Schiff-Basenbildner, Substanzen mit nukleophiler Substitution und Addition, Metalle), um die Anwendungsdomäne zu erweitern. Es ergaben sich bei paralleler Testung von 45 Substanzen in zwei unabhängigen Labors bei

40 (89 %) übereinstimmend Ergebnisse im DPRA, bei 5 Substanzen abweichende Resultate. Insgesamt zeigte der DPRA eine etwas höhere Rate an falsch negativen Resultaten als andere *in vitro* Systeme, nach den Autoren zum einen bedingt durch die fehlende Metabolisierung von Pro-Haptene im zellfreien System. Zum anderen wurden bei reaktiven Nukleophilen (S_N1 und S_N2 Mechanismus) gehäuft falsch negative Ergebnisse erhalten, was Urbisch et al. (2015) auf Konkurrenzreaktion mit Hydroxylgruppen, z.B. in Lösungsmitteln, zurückführen.

Laut Reisinger et al. (2015) ist dies einer der priorisierten Tests für eine Testbatterie zur Wirkstärkenbewertung, entwickelt durch die „Cosmetics Europe Skin Tolerance Task Force“.

Erste Versuche, den DPRA als Hochdurchsatzmethode zu etablieren, wurden bereits unternommen (Wong et al., 2016).

1.2.2.2 Peroxidase Peptide Reactivity Assay (PPRA; Gerberick et al., 2009; Lalko et al., 2013)

Als Weiterentwicklung des DPRA stellen die DPRA-Entwickler den PPRA vor. Mit diesem Test sollte es möglich sein Pro- und Prehaptene besser zu identifizieren. Ursprünglich wurde zu diesem Zweck Cystein für 24 h mit oder ohne Meerrettich-Peroxidase / Wasserstoffperoxid (HRP/P), während Lysin immer ohne HRP/P inkubiert wird. Im Gegensatz zum DPRA werden insgesamt acht Konzentrationen getestet, um Aussagen über die Konzentrations-Wirkungsbeziehung zu erhalten. Nach der Substanzinkubation werden die Proben via HPLC und Massenspektrometrie analysiert ((MS)/MS; maximale Testkonzentration: 5 mM mit Cystein, 25 mM mit Lysin). Ausgehend von den Konzentrations-Wirkungsdaten wird die EC25 (Konzentration bei der 25 % Modellpeptid depletiert sind) bestimmt (Anpassung von drei Parametern in einem log-logistic Modell). Eine Substanz wird als „reaktiv“ gewertet, wenn der EC25 Wert $\geq 0,1$ mM ist. Substanzen mit einem EC25 $< 0,1$ mM sind „hoch reaktiv“. In beiden Fällen wird die Substanz als sensibilisierend eingeschätzt. Wohingegen eine Substanz die weniger als 15,1 % Depletion aufweist als „minimal reaktiv“ und somit als nicht sensibilisierend gewertet wird (Gerberick et al., 2009). Die Testdurchführung wurde bereits modifiziert (Troutman et al., 2011; nur noch fünf Testkonzentrationen, Lysin ebenfalls mit HRP/P inkubiert bei 25°C, Bestimmung der EC15 mittels Anpassung von vier Parametern in einem log-logistic Modell; Substanz nicht sensibilisierend bei ≤ 10 % Peptid-Depletion). Eine neuere Publikation untersucht die Möglichkeit des Tests haut-sensibilisierende von atemwegssensibilisierenden Substanzen zu unterscheiden, die Autoren finden jedoch keinen Vorteil gegenüber dem üblichen DPRA für diese Fragestellung (Lalko et al., 2013).

Eine eindeutige Applikationsdomäne wurde bisher nicht definiert, es ist jedoch deutlich, dass der Test gegenüber dem DPRA Vorteile für Pro- und Prehaptene bietet. Der Validierungsstatus des Tests ist unklar. Allerdings ist laut Reisinger et al. (2015) dies einer der priorisierten Tests für eine Testbatterie zur Wirkstärkenbewertung, entwickelt durch die „Cosmetics Europe Skin Tolerance Task Force“.

1.2.2.2.3 Amino acid derivative reactivity assay - dilution method (ADRA-DM; Yamamoto et al., 2015)

Yamamoto et al. (2015) berichten eine modifizierte Form des DPRA, den „Amino acid derivative reactivity assay“ (ADRA) mit modifizierten Lysinen und Cysteinen. Dabei wurden die beiden Aminosäuren mit der Aminofunktion an Naphthalin gekoppelt. Dies hat den Vorteil, dass eine größere Wellenlänge (281 nm) in der HPLC-Analytik verwendet werden kann. Beim klassischen DPRA wird bei 220 nm gemessen, was mit zahlreichen Testsubstanzen interferiert und den Nachweis von Peptidreaktionen stören kann (Fujita et al., 2014). Aus diesem Grund ist der ADRA empfindlicher, so dass verringerte Konzentrationen der Testsubstanzen eingesetzt werden können (1/100 der im DPRA üblichen Konzentrationen, deshalb Bezeichnung ADRA-DM: dilution method). Dies hat den Vorteil, dass Löslichkeitsprobleme für hydrophile Substanzen in wässrigem Medium (Gerberick et al., 2008) vermindert werden. Die systemischen Nachteile des DPRA (nicht geeignet für Pro- und Pre-Haptene) hat auch der ADRA-DM. Beim jetzigen verwendeten Vorhersagemodell (Prediction model) kann aber nur qualitativ nach sensibilisierenden bzw. nichtsensibilisierenden Substanzen unterschieden werden. Hierbei wird eine mittlere Depletion von 7,75 % als Schwellenwert (negativ zu positiv) gewertet. Prinzipiell scheint aber auch eine quantitative Auswertung möglich. Dieser sogenannte ADRA-DM wurde an 82 Substanzen getestet und ergab bezogen auf Ergebnisse aus dem LLNA 7 falsch positive und 1 falsch negatives Resultat. Daraus resultierte eine „Accuracy“ von 90 %, also etwas besser als im gleichfalls durchgeführten DPRA (88 %). Ob dieser Test in der Praxis tatsächlich die genannten Vorteile bietet, muss die Zukunft zeigen. Auf Basis der bisherigen Substanzwahl scheint sich die Treffgenauigkeit (Accuracy) nicht wesentlich von der des DPRA zu unterscheiden. Eine Anwendungsdomäne ist bis jetzt nicht definiert. Beim jetzigen Stand des Wissens ist der Test noch nicht als ausreichend validiert zu betrachten.

1.2.2.2.4 Weitere Tests für MIE/KE1 gemäß „Adverse outcome pathway“ (OECD, 2012a; b)

Französische Arbeitsgruppen beschreiben, wie mit Hilfe anderer Techniken (high resolution magic angle spinning (HRMAS) nuclear magnetic resonance (NMR)) die Interaktion von einer sensibilisierenden Chemikalie mit den Strukturen eines 3D-Hautmodells sichtbar gemacht werden können. Sie weisen zudem auf die Limitierungen der bisher vorhandenen *in chemico* Haptensierungstests hin und stellen fest, dass neben den bekannten Thiol-Gruppen andere zelluläre Strukturen wie z.B. Histidin-Reste als Ziele der Haptensierungsreaktion vorkommen können und nicht vernachlässigt werden sollten (Debeuckelaere et al., 2015; Debeuckelaere et al., 2016). Eine Anwendungsdomäne ist bis jetzt nicht definiert. Beim jetzigen Stand des Wissens ist der Test noch nicht als ausreichend validiert zu betrachten.

1.2.2.3 Keratinozytenaktivierung

1.2.2.3.1 NCTC 25544 IL-18 Test

Der NCTC2544 IL-18 Tests wurde innerhalb des EU FP 6 geförderten Sens-it-iv Projekts entwickelt (siehe FP-0324, Corsini et al., 2009). Mittlerweile liegen zusätzliche Ergebnisse mit weiteren Substanzen vor (Corsini et al., 2013). Die Prävalidierung soll abgeschlossen sein (Teunis et al., 2013), jedoch waren noch keine Ergebnisse verfügbar. Teunis et al. (2013) berichten, die in FP-0324 angekündigten Ergebnisse eines Ringversuches des NCTC2544 Tests in Kombination mit dem epidermal equivalent (EE-Test, siehe 1.2.2.1.4), bei dem der

Test in verschiedenen Laboratorien anhand von Standardarbeitsanweisung (SOP) auf seine Reproduzierbarkeit geprüft wurde. Hierbei wurde als **1. Schritt** der NCTC2544 IL-18 Test durchgeführt, anhand dessen das sensibilisierende Potential ermittelt wurde. Eine Testchemikalie wird als sensibilisierend bewertet, wenn bei weniger als 20 % Zytotoxizität, der IL-18 Spiegel im Vergleich zur IL-18 Konzentration der Vehikelkontrolle in drei unabhängigen Experimenten um mindestens 1,2fach erhöht ist. Der **2. Schritt** ist die Durchführung des EE-Tests (Details und Vorhersagemodell siehe 1.2.2.1.4).

Im Ringversuch wurden, u.a. wegen der Verwendung unterschiedlicher Vehikel, z.T. abweichende Resultate erhalten, so dass eine weitere Präzisierung der SOP nötig scheint.

In der Arbeit vorgestellt von Gibbs et al. (2013) wird der Versuch vorgestellt diese beiden Schritte innerhalb eines Testsystems zu kombinieren. Zwei verschiedene „Epidermal Equivalent Potency Assays“ (3D-Epidermale Modelle zur Bestimmung der irritativen bzw. korrosiven Eigenschaften einer Substanz) wurden kombiniert mit einem nachgeschalteten MTT-Test (Bestimmung der Zytotoxizität) und einem IL-18 Assay (Freisetzung ins Kulturmedium aus den 3D-Kulturen). Zu einer Prävalidierung wurden die Tests in zwei unabhängigen Labors durchgeführt. Auch andere Autoren entwickelten ähnliche Testsysteme (siehe z.B. Mehling et al., 2012). Mittels dieses Systems wurden von Gibbs et al. (2013) 17 sensibilisierende und 13 nicht sensibilisierende Substanzen getestet und mit Human- und LLNA-Daten verglichen. Das beste Vorhersagemodell (IL-18 Stimulationsindex ≥ 5 bei 60-95 % Zytotoxizität, EC₅-EC₄₀) resultierte in einer „Accuracy“ von 95 % (in beiden Labors) für die qualitative Abschätzung. Damit ist dieses Vorhersagemodell allerdings wesentlich von einer hohen Zytotoxizität, d.h. reizender Wirkung, in diesem kombinierten Testsystem bestimmt. Die EC₅₀-Ergebnisse des Epidermal Equivalent Potency Assays zeigten in der quantitativen Abstufung eine signifikante Korrelation zu *in vivo* Daten, besser zu Humandaten (DSA₀₅: Induktionsdosis, welche in 5 % der Testpopulation zu Sensibilisierung führt) als zu LLNA-Daten ($p < 0,0061$ vs. $0,0542$). Die IL-18 Sekretion (Schwellenwert 2-facher Stimulationsindex) zeigte jedoch qualitativ eine signifikante Korrelation nur zu den DSA₀₅-Daten, nicht aber den LLNA-Ergebnissen ($p < 0,0154$ vs. $0,0603$). Diese ITS von Gibbs et al. (2013) liefert derzeit keine quantitative Abschätzung der Wirkstärke, Kriterien für eine solche müssten erst entwickelt werden. Bei diesem Testsystem war ein klarer Vehikeleinfluss ersichtlich: Das Lösungsmittel Ethanol führte zu geringerer IL-18 Sekretion als bei Verwendung von Aceton/Olivenöl. Insofern scheint für weitere Vergleiche die Wahl eines einheitlichen Lösungsmittels angebracht.

1.2.2.3.2 ARE-Nrf2 Luciferase Assays (z.B. KeratinoSensTM; OECD TG 442D)

Der bereits in FP-0324 beschriebene ARE-Nrf2 Luciferase Assay (z.B. KeratinoSensTM) ist mittlerweile validiert. Es liegt eine ECVAM Empfehlung inkl. Validierungsstudie vor (EC, 2014), sowie eine OECD Testing Guideline (OECD, 2015b). Laut TG 442D kann der Test bei positivem Ergebnis zur Einstufung als SkinSens Cat 1 (nach UN GHS (United Nations, 2013)) genutzt werden, um eine Einstufung als „Non-Sensitiser“ zu erreichen muss der Test Teil einer Integrierten Teststrategie sein (siehe auch 1.3). Cut-off Werte für eine Wirkstärkenbetrachtung wurden bisher nicht validiert und befinden sich noch immer in der wissenschaftlichen Entwicklung.

Das in der TG beschriebene Testprinzip entspricht dem in FP-0324 beschriebenen Verfahren. Zusätzlich wurden veränderte Aussagen zur Zahl der Wiederholungen innerhalb eines Experiments gemacht, Hinweise zur Anwendungsdomäne und Akzeptanzkriterien für

Experimente gegeben, verschiedene Limitierungen genannt und ein Vorhersagemodell zur Einstufung entwickelt (siehe Abbildung 4). Die zusätzliche Information aus der Testrichtlinie und der aktualisierten Entwurfsfassung der endpunktspezifischen Leitlinie der ECHA („Draft guidance IR&CSA R.7a“, Juni 2016) wird im Folgenden kurz zusammengefasst.

- Ein Experiment muss aus mindestens zwei unabhängigen Wiederholungen an unterschiedlichen Tagen mit mindestens drei Replikaten (also $n = 6$) erfolgen. Bei un schlüssigen Testergebnissen muss eine dritte Wiederholung mit drei Replikaten stattfinden ($n_{\text{total}} = 9$).
- Zur Vermeidung der Verflüchtigung von leicht flüchtigen Testchemikalien oder von Cross-Kontaminationen sollte man die Testplatten vor der Inkubation beispielsweise mit Folie abdecken.
- Die zu testenden Chemikalien sollten bis hin zur höchsten geforderten Testkonzentration von 2000 μM gelöst in Wasser oder DMSO vorliegen oder zumindest eine stabile Dispersion bilden. Chemikalien, die nicht bis zur höchsten geforderten Konzentration löslich sind können bis hin zur höchsten Löslichkeitskonzentration getestet werden. Die Aussagekraft eines solchen Tests ist jedoch limitiert. Ein positives Testergebnis kann zur Bestätigung einer hautsensibilisierenden Chemikalie genutzt werden, bei einem negativen Ergebnis und einer maximalen getesteten Konzentration von $< 1000 \mu\text{M}$ sollte das Ergebnis als „inconclusive“ betrachtet werden.
- Anwendungsdomäne: getestet werden können Substanzen mit einem Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) bis hin zu 5. Liegt der $\log K_{O/W}$ zwischen 5 und 7 so hat das Testergebnis eine limitierte Aussagekraft. Substanzen mit einem $\log K_{O/W}$ von > 7 liegen außerhalb der Anwendungsdomäne.
- Der KeratinoSensTM hat eine Tendenz, für vermehrt falsch negative Vorhersagen („underprediction“) bei Chemikalien mit geringer bis mittlerer Wirkstärke (d.h. UN GHS subcategory 1B) im Gegensatz zu Chemikalien mit höherer sensibilisierender Wirkstärke (d. h. UN GHS subcategory 1A).
- Negative Testergebnisse sind, wie bei *in vitro* Versuchen üblich, vorsichtig zu interpretieren. Beispielsweise kann es bei Substanzen, die ausschließlich mit Lysinresten reagieren zu falsch negativen Vorhersagen kommen. Außerdem besitzen die verwendeten Keratinozyten nur eine limitierte metabolische Aktivität und anhand der Testbedingungen, kann es bei Pro- und Pre-Haptenen (vor allem bei solchen mit einer langsamen Oxidationsrate) zu negativen Testergebnissen kommen. Andererseits kann es bei Chemikalien, die als chemische Stressoren agieren, aber keine hautsensibilisierenden Eigenschaften besitzen zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Stark zytotoxische Chemikalien können falsch positive Testergebnisse bewirken. Chemikalien, die mit dem Luziferaseenzym interagieren können die Auslesung behindern (sowohl Inhibition, als auch Induktion möglich).

Die Interpretation der Testergebnisse unterliegt bestimmten Regeln und diese werden in einem Vorhersagemodell festgelegt. Um als positiv zu gelten, muss eine Substanz alle der vier folgenden Bedingungen in beiden Wiederholungen oder in zwei von drei Wiederholungen erfüllen, andernfalls gilt die Substanz als negativ (siehe Abbildung 4):

1. Der I_{\max} Wert ist größer als 1,5 und statistisch signifikant unterschiedlich zur Lösemittelkontrolle (Negativkontrolle, zweiseitiger, ungepaarter Student's T-test),
2. die Zellviabilität liegt bei über 70 % bei der niedrigsten Konzentration, die mindestens eine 1,5fache Induktion der Luziferaseaktivität auslöst (d.h. EC_{1,5} bestimmende Konzentration),
3. der EC_{1,5} Wert liegt unter 1000 μM (oder 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei Testchemikalien ohne definiertes Molekulargewicht) und ,
4. Es gibt eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die Luziferaseinduktion (oder biphasischer Verlauf, weitere Details hierzu finden sich in Abschnitt 33 der OECD TG 442D).

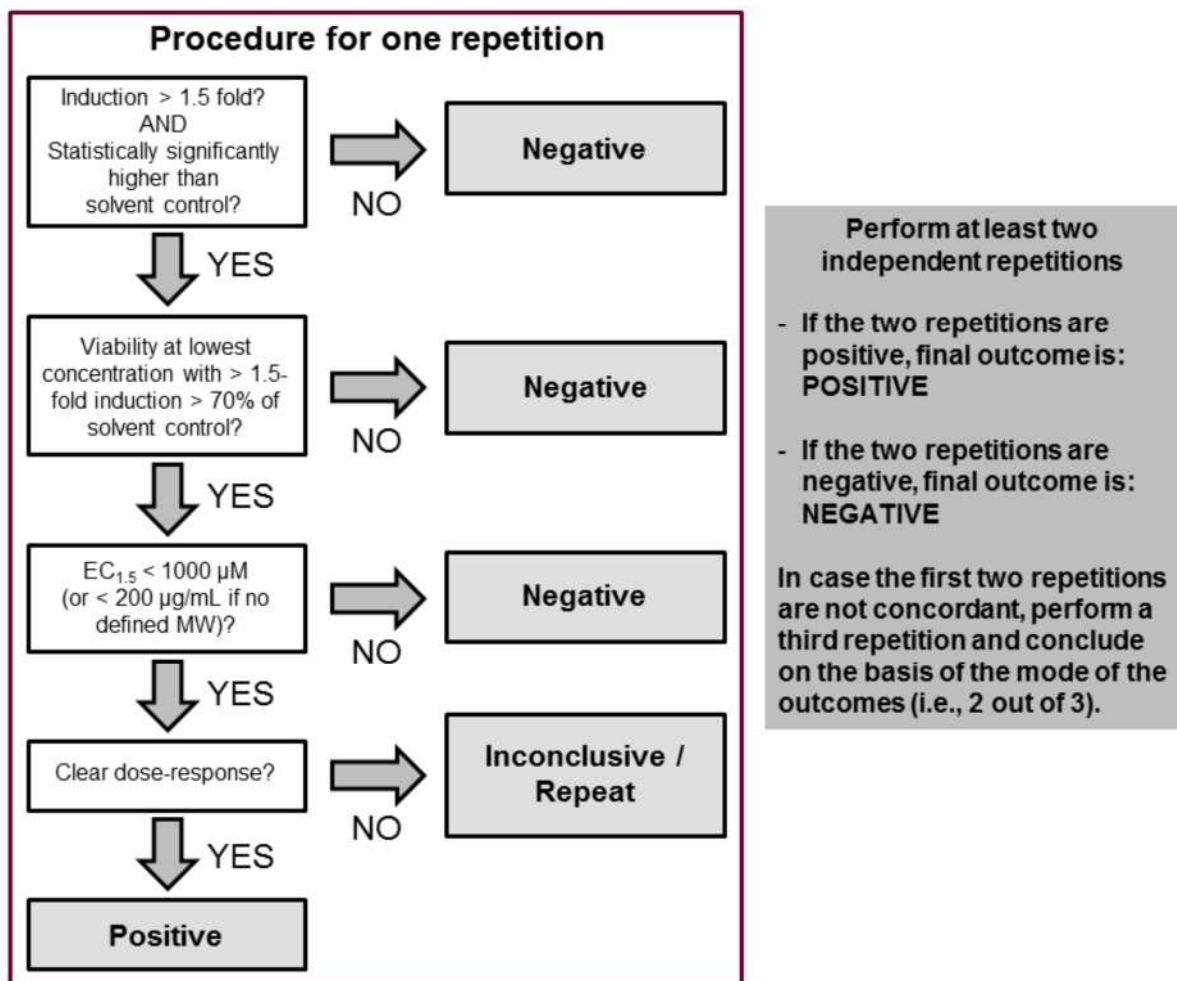


Abbildung 4 Vorhersagemodell zum ARE-Nrf2 Luciferase Assays (z.B. KeratinoSens™; OECD TG 442D)

Mehrere Autoren verwenden diesen Test in Integrierten Teststrategien (siehe Abschnitt 1.3).

Als Einschränkung (jedoch nicht als klare Abgrenzung einer Anwendungsdomäne) wurde in OECD TG 442D berichtet, dass bei Testsubstanzen mit einem $\log K_{O/W} > 3,5$, d.h. geringer Wasserlöslichkeit, gehäuft falsch negative Resultate beobachtet wurden. Insofern sollten

negative Ergebnisse für diese Substanzen als nicht schlüssig bewertet werden. Positive Resultate scheinen aber verlässlich.

Einen ähnlichen Test verwenden Tsujita-Inoue et al. (2014) und Hirota et al. (2015). Hierbei werden AREc2-Zellen eingesetzt, welche eine transgene MCF7 Brustkarzinomzelllinie mit einem Luziferase-Reporter gen darstellen. Es handelt sich dabei um eine leicht modifizierte Variante des Tests von Natsch und Emter (2008), der Vorläuferversion des KeratinoSens™.

Eine Parallelentwicklung zum KeratinoSens™ ist der LuSens-Assay (Bauch et al., 2012; Ramirez et al., 2014). Auch hier wird die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT mit einem Reporter gen für Luciferase unter Kontrolle eines antioxidativ-responsiven Elements (ARE) verwendet, welches die Freisetzung des Nrf2 Transkriptionsfaktors durch Lumineszenz detektiert. Bei einer Testung mit 54 Substanzen waren Sensitivität, Spezifität und „Accuracy“ sehr ähnlich den Ergebnissen aus dem KeratinoSens™. Die Befunde zur Vorhersage der sensibilisierenden Wirkung aus beiden Tests können daher im Wesentlichen übertragen werden (Bauch et al., 2012). Dennoch scheint es angeraten, weitere Testungen im Rahmen dieses Projektes mit dem KeratinoSens™ durchzuführen, da der LuSens formal noch nicht validiert ist.

Laut Reisinger et al. (2015) ist dies einer der priorisierten Tests für eine Testbatterie zur Wirkstärkenbewertung, entwickelt durch die „Cosmetics Europe Skin Tolerance Task Force“.

1.2.2.3.3 EpiSensA (Saito et al., 2013b) und ähnliche Modelle (McKim et al., 2012)

In FP-0324 wurden zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit und Hautpermeabilität dreidimensionale Hautmodelle beschrieben (z.B. EpiDerm™). Dieses Testsystem wurde mittlerweile von Saito et al. (2013b) auch zur Bestimmung der Keratinozytenreaktion verwendet (EpiSensA). Dabei werden nach Kontakt mit einem Allergen die Expression von fünf Genen in einem Microarray-Assay gemessen, welche mit der Keratinozytenaktivierung in Bezug stehen. Als Testsubstanzen wurden acht sensibilisierende und vier nicht sensibilisierende Verbindungen sowie vier Prä- bzw. Prohaptene verwendet. Unter den fünf untersuchten Genen zeigten die Induktionsmuster der Expression von drei dieser Gene („Activating Transcription Factor 3“ (*ATF3*), „DnaJ-like heat shock protein“ (*DNAJB4*) und „Glutamate-Cysteine Ligase, Modifier Subunit Proteine“ (*GCLM*)) qualitativ eine hohe Übereinstimmung mit den Ergebnissen des LLNA. Allerdings scheint keine quantitative Übereinstimmung vorzuliegen. Wegen der hohen Komplexität und der fehlenden Validierung kommt dieser Test nicht für eine Verwendung im Rahmen dieses Projekts in Frage.

Einen ähnlich konzipierten Test (SenCeeTox) beschrieben McKim et al. (2012). Auch hier wurden dreidimensionale Hautmodelle (EpiDerm™, SkinEthic RHE) gegenüber Testsubstanzen exponiert und die Keratinozytenreaktion über die Expression von 11 Genen (u.a. des Keap1-Nrf2-ARE-Signalweges) bestimmt. Dieses Modell erlaubt auch quantitative Aussagen zur Wirkstärke. Auf Basis eines Trainingssets von 11 Substanzen wurden 7 Testsubstanzen überprüft. Hierbei ergab sich eine 100 % korrekte Zuordnung bei qualitativer Unterscheidung, jedoch nur eine „Accuracy“ von 71 % bei quantitativer Differenzierung. Wegen der hohen Komplexität und der fehlenden Validierung kommt auch dieser Test nicht für eine Verwendung im Rahmen dieses Projekts in Frage (Anmerkung: ein Vorgängertest mit demselben Prinzip nutzt anstelle des 3D-Hautmodells noch die HaCaT Zelllinie (McKim et al., 2010)).

1.2.2.3.4 Gensignatur-Assay, SENS-IS (Cottrez et al., 2015; 2016)

Die Autoren identifizierten über „Data mining“ und Literaturrecherche mittels eigens für diesen Zweck entwickeltem Analyse-Tool zunächst 200 Gene, die in Zusammenhang mit Prozessen während der Hautsensibilisierung stehen. Der Test wurde mit 20 sensibilisierenden und 20 nicht-sensibilisierenden Chemikalien erprobt. Die flüssigen/viskösen sensibilisierenden Chemikalien wurden in Konzentrationen gemäß ihrer sensibilisierenden Wirkstärke im LLNA auf ein humanes Hautmodell (Episkin®) aufgetragen (d.h. Wirkklasse extrem = 0,1 % Expositionskonzentration; stark = 1 %, moderat = 10 % und schwach/keine Sensibilisierer = 50 %). Nach 15 minütiger Exposition bei 37 °C wurden die Chemikalien von der Haut entfernt, die Oberfläche gereinigt und für weitere 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Expression der Gene mittels quantitativer Real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) gemessen. Es wurden zwei unterschiedliche Gensets identifiziert, die im Fall einer Sensibilisierungsreaktion überexprimiert sind (cut-off > 1,3fache Überexpression) – a) die auch in anderen Tests verwendete Gruppe der Nrf2-kontrollierten ARE Gene (REDOX Panel, insgesamt 24 Gene) und b) das sogenannte SENS-IS Panel (insgesamt 41 Gene, u.a. assoziiert mit Inflammationsprozessen, Reparaturprozessen, Hitzeschockproteinen und Zelltod/Apoptose). Es wurde dabei deutlich, dass für ein verlässliches Prädiktionsmodell nicht die Expressionsintensität bestimmter Gene herangezogen werden sollte, sondern die Anzahl der über dem Cut-off exprimierten Gene. Um eine Substanz als sensibilisierend zu identifizieren, müssen daher mindestens 10 Gene des ARE Panels und/oder 18 Gene des SENS-IS Panels überexprimiert sein. Neben der einfachen Gefahrenidentifikation sieht der Test ebenfalls ein Protokoll und ein Prädiktionsmodell zur Wirkstärkenbewertung vor. Dazu wird jede Chemikalie in vier unterschiedlichen Konzentrationen (0, 1; 1, 10 und 50 %) auf das Episkin®-Modell aufgetragen. Jede Konzentration wird ausgewertet nach dem obigen Prädiktionsmodell (positiv und negativ), dabei werden Konzentrationen die eine überschießende Zytotoxizität/Irritation aufweisen von der Auswertung ausgeschlossen. Als Maßstäbe für Zytotoxizität/Irritation gelten a) CT (cycle value)- Wert für das *HSPAA1* Gen darf nicht größer als 110 % der korrespondierenden Vehikelkontrolle sein und b) weniger als 20 der 24 Gene für Reizung sind überexprimiert (IRR Test Panel). Das Prädiktionsmodell für die Wirkstärkenbewertung sieht demnach vor, dass die minimale Konzentration, die zu einem positiven Ergebnis führt bestimmend für die Wirkstärke ist (d.h. falls positiv bei 50 %, dann ist die Chemikalie ein schwacher Sensibilisierer, bei 10 % ist die Chemikalie als moderat sensibilisierend anzusehen etc). Mit diesem Prädiktionsmodell wird eine Korrelation von > 90 % verglichen mit den Ergebnissen aus dem LLNA erreicht (48 von 50 getesteten Chemikalien) (Cottrez et al., 2015).

Die Methode wurde bereits in einer externen Validierungsstudie erprobt (19 Chemikalien im Ringversuch und insgesamt zusätzlich 150 Chemikalien in einem Labor getestet). Die zu testenden Gen-Panels wurden reduziert und das damit einhergehende Prädiktionsmodell angepasst. Für das REDOX Panel wurden 17 Gene untersucht und das SENS-IS Panel beinhaltet noch 21 Gene. Eine Chemikalie wird als sensibilisierend bewertet, wenn sie zur Überexpression (> 1,3fach) von mindestens 7 Genen aus dem REDOX oder SENS-IS Panel führt. Für die Wirkstärkenbetrachtung gelten die gleichen Grenzen wie im Ursprungstest, die erste Konzentration, in der mindestens 7 Gene überexprimiert sind, wird als potenzbestimmend gewertet. Für die Bewertung der reizenden Eigenschaften der Haut gilt weiterhin a) CT (cycle value)- Wert für das *hspaa1* Gen darf nicht größer als 110 % der korrespondierenden Vehikelkontrolle sein und b) weniger als 20 der 23 Gene für Reizung sind überexprimiert (IRR Test Panel). Die erzielten Ergebnisse müssen für jede Chemikalie

dabei für eine eindeutige Zuordnung mit mindestens zwei unterschiedlichen Batches des humanen Hautmodells betätigt werden (berücksichtigt die Hautmodellvariabilität). Der Test war leicht zwischen den Laboren zu übertragen. Hinsichtlich Verlässlichkeit („robustness“), Variabilität (innerhalb (WLR) und zwischen den Laboren (BLR); \emptyset WLR = 91,3 %, \emptyset BLR = 89,5 %) und Prädiktivität des Tests wurden sehr gute Ergebnisse erzielt („Accuracy“ für Wirkstärkenbewertung im Vergleich zu Daten aus dem LLNA = 92.6 % (n = 150) bzw. Humandaten = 90.6 % (n = 64)) (Cottrez et al., 2016). Die Validierung soll im Herbst 2016 weiter fortgeführt werden (EC, 2015)².

Im vorliegenden Projekt wurde diese neue Methode zunächst nicht angewandt, scheint aber für die Zukunft durchaus vielversprechend. Laut Reisinger et al. (2015) ist dies auch einer der priorisierten Tests für eine Testbatterie zur Wirkstärkenbewertung, entwickelt durch die „Cosmetics Europe Skin Tolerance Task Force“.

1.2.2.3.5 Gensignatur-Assay, Microarray in HaCaT-Zellen (van der Veen et al., 2013)

Der Test basiert auf demselben Prinzip wie der KeratinoSens™, d.h. er untersucht die Genexpression in HaCaT-Zellen, allerdings nicht mit einem Reporter gen wie bei KeratinoSens™ und den verwandten Assays, sondern über eine Transkriptionsanalyse mehrerer Gene. Die Auswahl der insgesamt 10 Indikator gene erfolgte anhand der Genprofile von sensibilisierenden und nichtsensibilisierenden Substanzen. Sie umfasste Gene, welche eine Rolle bei der DNA-Methylierung, der Reaktion auf oxidativen Stress, Entzündungsreaktionen und alternativem Splicing spielen. Mittels eines speziellen Algorithmus (Support Vector Machine) wurde das sensibilisierende Potenzial bestimmt („Accuracy“ in Bezug auf Humandaten: 85.7 %, LLNA für dieses Set von Substanzen: 78,4 %; van der Veen et al., 2013). Dieser Test erlaubt beim verwendeten Algorithmus derzeit nur eine qualitative Unterscheidung, eine quantitative Analyse scheint aber möglich (van der Veen et al., 2014). Der Test ist zudem zu komplex für eine Verwendung im Rahmen dieses Projektes und eine Validierung steht noch aus.

1.2.2.4 Reifung und Migration dendritischer Zellen

1.2.2.4.1 U-SENS™ (früher MUSST (Myeloid U937 Skin Sensitisation Test) (Piroird et al., 2015))

Der U-SENS™ Assay ersetzt den MUSST. Im Test wird die Expression des Oberflächenmarkers CD86, als Maß für die Reifung der dendritischen Zellen, im Durchflusszytometer erfasst. Generell dient der Test zunächst zur Charakterisierung des sensibilisierenden Potentials einer Substanz (Vorhersagemodell: sensibilisierend vs. nicht sensibilisierend). Eine Substanz wird als positiv erachtet, wenn sie die Genexpression von CD86 in einer nicht zytotoxischen Konzentration (Zellviabilität \geq 70 %) um \geq 50 % induziert (d.h. EC150). Der EC150 Wert wird dabei mittels Regressionsanalyse aus den getesteten Konzentrationen, die obige Kriterien erfüllen berechnet. Nach Auswertung von 175 Chemikalien zeigt der Test ein mit anderen *in vitro* Tests vergleichbares Ergebnis (88 % Treffgenauigkeit, 79 % Spezifität, 90 % Sensitivität). Für die Wirkstärkenbeurteilung wird versucht, eine Korrelation mit Daten aus dem LLNA zu erstellen. Dies birgt jedoch die Unsicherheit, dass für den Menschen falsche Annahmen zu bestimmten Substanzen aus dem Tierversuch übernommen werden. Deswegen werden,

² vorgestellt von Laura Rossi (ECHA) im continuous education course bei der Eurotox2016

wenn möglich ebenfalls Humandaten herangezogen. Laut den Autoren sollte die Potenzbewertung jedoch immer im Rahmen der Anwendung einer ITS³ erfolgen. Erste cut-off Werte⁴ etabliert auf Basis von LLNA Daten liefern für die Einordnung in die CLP Kategorien 1A und 1B (EC, 2008) akzeptable Ergebnisse (82 % der Kat. 1A (41/50) und 73 % der Kat. 1B/keine Kat (85/116) sind richtig eingeordnet). Nimmt man Humandaten⁵ anstelle der Tierdaten, ergeben sich vergleichbare Ergebnisse (76 % der Gruppe A (19/25) und 82 % der Gruppe B (62/76) wurden korrekt vorhergesagt).

Eine Entwurfsfassung der OECD Prüfvorschrift ist verfügbar (hier finden sich weitere Details zur Testdurchführung, Applikationsdomäne, Vorhersagemodell (prediction model), etc., Stand Juli 2016)⁶. Der Peer-Review der Validierung ist abgeschlossen, jedoch noch nicht veröffentlicht. Der Test sollte zukünftig für eine Wirkstärkenbewertung ggfs. berücksichtigt werden.

1.2.2.4.2 Human Cell Line Activation Test (h-CLAT; OECD TG 442E)

Der bereits in FP-0324 beschriebene Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) ist mittlerweile validiert. Es liegt eine ECVAM Empfehlung inkl. Validierungsstudie (EC, 2015), sowie eine OECD Testing Guideline (TG) vor (OECD, 2016a).

Das in der TG beschriebene Testprinzip entspricht dem in FP-0324 beschriebenen Verfahren. Zusätzlich wurden Hinweise zur Anwendungsdomäne und Akzeptanzkriterien für Experimente gegeben, verschiedene Limitierungen genannt und ein Vorhersagemodell zur Einstufung entwickelt (siehe Abbildung 5). Die zusätzliche Information aus der Testrichtlinie und der aktualisierten Entwurfsfassung der endpunktspezifischen Leitlinie der ECHA („Draft guidance IR&CSA R.7a“, Juni 2016) wird im Folgenden kurz zusammengefasst.

- Anwendungsdomäne: getestet werden können Substanzen, die löslich sind oder stabile Dispersion bilden und mit einem Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) $\leq 3,5$. Ist der $\log K_{O/W} > 3,5$, sollte ein negatives Ergebnis nicht gewertet werden (falsch negative möglich). Ein positives Ergebnis kann jedoch als Hinweis auf eine sensibilisierende Substanz gewertet werden.
- Negative Testergebnisse sind, wie bei *in vitro* Versuchen üblich, vorsichtig zu interpretieren. Auf Basis der limitierten metabolischen Aktivität der verwendeten Zellen und anhand der Testbedingungen, kann es bei Pro- und Pre-Haptenen (vor allem bei solchen mit einer langsamen Oxidationsrate) zu negativen Testergebnissen kommen.
- Die sensibilisierenden Eigenschaften stark zytotoxische Chemikalien können nicht immer verlässlich überprüft werden (falsch positive Testergebnisse möglich).

³ 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-ENV/JM/HA(2016)11

⁴ Kat1A: $EC_{150} \leq 40 \mu\text{g/mL}$ und $CV_{70} \leq 100 \mu\text{g/mL}$, alle anderen sind dann Kat1B/keine Kategorie

⁵ Cut off: Gruppe A (d.h. starke sensibilisierer Klasse 1 und 2 nach den humanen Wirkstärkeklassen) $EC_{150} \leq 7 \mu\text{g/mL}$; Alle anderen Fallen in Gruppe B (Klassen 3-6 nach humaner Wirkstärke, schwache Allergene und nicht sensibilisierende Substanzen). Der CV70 Wert liefert keine zusätzliche Information.

⁶ OECD draft testing guideline http://www.oecd.org/env/ehs/testing/TG_USENS_draft1%20July20%202016.pdf

- Stark fluoreszierende Chemikalien, die im selben Längenbereich emittieren, wie der zur Messung benötigte FITC markierte Antikörper, können auf Basis der entstehenden Interferenzen nicht ausgewertet werden.

Die Interpretation der Testergebnisse unterliegt bestimmten Regeln und diese werden in einem Vorhersagemodell festgelegt. Um als positiv zu gelten muss eine Substanz mindestens eine der zwei folgenden Bedingungen in beiden Wiederholungen oder in zwei von drei Wiederholungen erfüllen, andernfalls gilt die Substanz als negativ (siehe Abbildung 5):

1. CD86 Expression (berichtet als RFI = relative fluorescence intensity) muss bei weniger als 50 % Zytotoxizität um $\geq 50\%$ im Vergleich zur Kontrolle induziert sein (EC150)
2. CD54 Expression (als RFI) muss bei weniger als 50 % Zytotoxizität $\geq 100\%$ im Vergleich zur Kontrolle induziert sein (EC200)

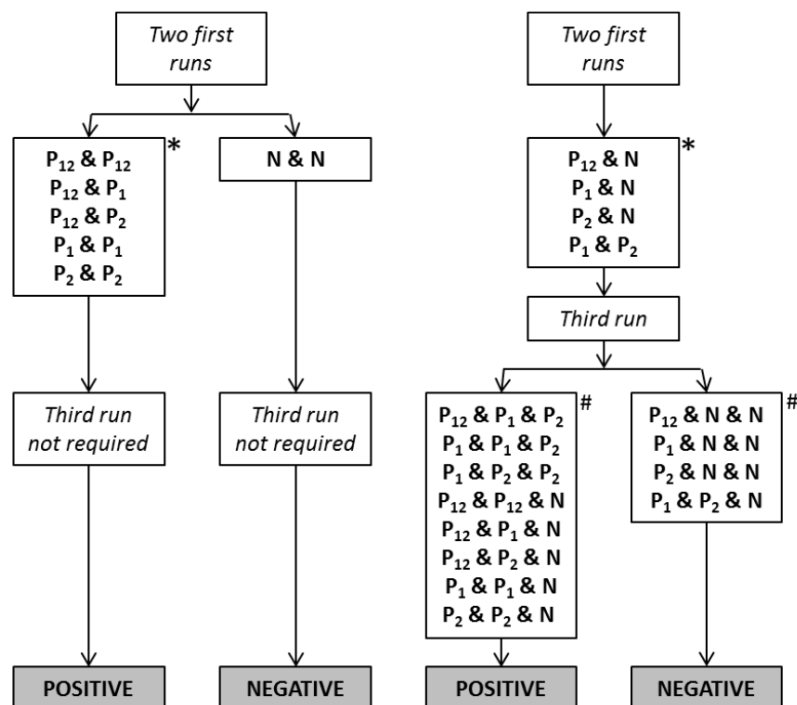


Abbildung 5 Vorhersagemodell zum h-CLAT (OECD TG 442E)

P1: Versuch nur mit CD86 positiv; P2: Versuch nur mit CD54 positiv; P12: Versuch mit CD86 und CD54 positiv; N: Versuch weder mit CD86 noch CD54 positiv. *zeigt die relevanten Kombinationen der ersten zwei Experimente, unabhängig von der Reihenfolge der Ergebnisse #zeigt die relevanten Kombinationen von insgesamt drei Experimenten, die auf Basis der unentschiedenen Ergebnisse in den ersten zwei Experimenten erzielt wurden, spiegelt jedoch nicht die Reihenfolge der Ergebnisse wieder

Mehrere Autoren verwenden diesen Test in Integrierten Teststrategien (siehe Abschnitt 1.3).

Beispielsweise nutzt Nukada et al. (2013) den h-CLAT in Kombination mit dem DPRA und dem Expertensystem „DEREK“ für ihre ITS zur Vorhersage des hautsensibilisierenden Potenzials einer Substanz, aber auch für die Vorhersage der Wirkstärke. Im schrittweisen Ansatz mit h-CLAT und DPRA wird eine Treffgenauigkeit von 86 % und 73 % für die Potenzial und Potenzvorhersage erzielt.

Laut Reisinger et al. (2015) ist dies einer der priorisierten Tests für eine Testbatterie zur Wirkstärkenbewertung, entwickelt durch die „Cosmetics Europe Skin Tolerance Task Force“.

1.2.2.4.3 VitoSens (Hooyberghs et al., 2008; Lambrechts et al., 2010)

Der Test wurde bereits im Bericht zu FP-0324 vorgestellt. Es konnten keine aktuelleren Daten gefunden werden.

Laut Reisinger et al. (2015) ist dies einer der priorisierten Tests für eine Testbatterie zur Wirkstärkenbewertung, entwickelt durch die „Cosmetics Europe Skin Tolerance Task Force“.

1.2.2.4.4 Modifikation des Loose-fit coculture sensitisation assay (LCSA) (Sonnenburg et al., 2012; 2015)

Bereits im Vorläuferprojekt FP-0324 wurde dieses Testsystem (Kokultur von humanen Keratinozyten und Monozyten) beschrieben. Es erlaubt eine quantitative Bestimmung der sensibilisierenden Potenz. Das angewandte Vorhersagemodell sieht anhand der Bestimmung der Konzentration mit halbmaximaler CD86 Expression ($EC_{50_{sens}}$) fünf Kategorien ausgehend von den LLNA-Kategorien (ECETOC, 2003) vor: $< 12,5 \mu\text{M}$ = extrem; $< 50 \mu\text{M}$ = stark; $< 100 \mu\text{M}$ = moderat; $> 100 \mu\text{M}$ = schwach. Substanzen die zu keiner CD86 Induktion führen werden als nicht sensibilisierend eingeschätzt. Im vorliegenden Projekt würde dementsprechend ein $EC_{50_{sens}} < 100 \mu\text{M}$ als Hinweis für die Gruppe HS dienen (LLNA-Kategorie moderat entspricht dabei einem EC3 Wert von 10 %, dieser stellt im vorliegenden Projekt die Grenze zwischen der Gruppe HS und GMS dar). Größere $EC_{50_{sens}}$ Werte weisen demnach auf GMS hin. Sonnenburg et al. (2012; 2015) verwendeten den Test für Konservierungs- und Farbstoffe und analysierten zusätzlich quantitativ die zytotoxische Wirkung mittels 7-AAD-(p-Aminoacetanilide)-Färbung. Diese Färbung wurde in früheren Veröffentlichungen nur verwendet, um lebensfähige Zellen auf die CD86 Expression zu selektieren. Damit erlaubt der Test eine parallele Abschätzung der reizenden (zytotoxischen) und sensibilisierenden Potenz. Weitere Publikationen derselben Arbeitsgruppe beschäftigen sich mit möglichen Limitierungen des Tests bei ungesättigten Verbindungen (Frohwein et al., 2016) bzw. wie der Tests modifiziert werden kann, um für ein High-throughput Screening in Frage zu kommen (Frombach et al., 2016a; b).

Eine eindeutige Anwendungsdomäne ist bisher nicht definiert. Bisher wurden keine im Projekt relevanten Stoffe im LCSA überprüft. Über den Validierungsstatus liegen bisher keine weiteren Informationen vor. Dieser Test ist komplex und nicht für eine Verwendung im Rahmen dieses Projekts geeignet. Die Entwicklung des Tests bzgl. einer zukünftig möglichen Wirkstärkenbewertung sollte jedoch verfolgt werden.

1.2.2.4.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in THP-1-Zellen (Saito et al., 2013a)

Es liegen einige Hinweise vor, dass die Reifung dendritischer Zellen mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch sensibilisierende Substanzen in Zusammenhang steht. Zahlreiche Sensibilisierer induzieren ROS in dendritischen Zellen oder verwandten Zelllinien. Weiterhin wird z.B. in transgenen Mäusen mit einer Überexpression der Superoxiddismutase (Enzym, was bei der Inaktivierung von ROS eine zentrale Rolle spielt) die Migration dendritischer Zellen und die Sensibilisierung durch Trinitrochlorbenzol inhibiert (Saito et al., 2013a). Diese Autoren untersuchten deshalb, ob die Induktion von ROS in THP-1-Zellen (welche auch im h-CLAT verwendet werden) als Maß der sensibilisierenden

Wirkstärke geeignet ist. Dabei wurden die Zellen mit einem ROS-sensitivem Fluoreszenzfarbstoff (5- (und 6-)chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat Acetyl ester (CM-H₂DCFDA) beladen und mit Testchemikalien inkubiert, wobei die Konzentrationen nicht mehr als 10 % Zytotoxizität verursachen sollen. Die Fluoreszenzintensität als Maß für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird mittels FACS (fluorescence-activated cell sorting) gemessen. Die „Accuracy“ dieses Testsystems zum LLNA war bei einer Testreihe mit 50 Substanzen 82 % (Vorhersagemodell: 2fache ROS Induktion (EC₂) bei mindestens 90 % lebenden Zellen, Spezifität 80 %, Sensitivität 83 %). Es zeigte sich weiterhin eine gute Korrelation einer 2fachen Induktion von ROS als Benchmark zu den EC₃ Werten im LLNA, so dass diese Testmethode möglicherweise als zusätzliches Instrument einer *in vitro* Testung des sensibilisierenden Potenzials und der Potenz in Frage kommt (noch keine eindeutigen cut-off Werte bestimmt). Eine Anwendungsdomäne ist bis jetzt nicht definiert. Beim jetzigen Stand des Wissens ist der Test noch nicht als ausreichend validiert zu betrachten.

1.2.2.4.6 SH-Assay (Suzuki et al., 2009)

Suzuki et al (2009) beobachteten, dass Kontakt von Haptenen mit THP-1-Zellen zu einer Abnahme der Thiolgruppen an der Zelloberfläche führt, unabhängig vom Differenzierungsstand der Zellen. Die Autoren diskutieren als Hintergrund eine Reaktion der Haptene mit den SH-Gruppen von Membranproteinen. Allerdings wurde für wenige Allergene, z.B. Diphenylcyclopropenon, MnCl₂ und Thimoserol ein Anstieg der Thiole auf der Zelloberfläche beobachtet, möglicherweise wegen einer Reduktion von Disulfidgruppen der Membranproteine. Als höchste Konzentration wurde generell eine Konzentration gewählt, bei der in einem Vorversuch 50 % Zytotoxizität auftrat (IC₅₀). Die Oberflächenthiole werden dann bei dieser Konzentration und Verdünnungen davon (bei lipophilen Substanzen in DMSO) nach 2 h Inkubation mit der Testsubstanz und anschließender Behandlung mit einem Fluoreszenzfarbstoff mittels Fluoreszenz-Zytometrie bestimmt. Unter Verwendung eines Bewertungsmodells mit entweder einer Abnahme oder einer Zunahme um je mindestens 15 %, d.h. < 85 % oder > 115 % des Kontrollwertes entwickelten die Autoren den „SH-Assay“. Mittels dieser Kriterien konnte eine Übereinstimmung mit *in vivo* Daten von 90 % erhalten werden, allerdings nur auf qualitativer Basis. Ein geeignetes Bewertungsmodell für quantitative Aussagen steht aber noch aus. Der SH-Assay wurde bereits von Hirota et al. (2015) in deren Integrierter Teststrategie (ITS) verwendet. Eine Anwendungsdomäne ist bis jetzt nicht definiert. Beim jetzigen Stand des Wissens ist der Test allerdings noch nicht als ausreichend validiert zu betrachten.

1.2.2.4.7 Genomic Allergen Rapid Detection (GARD; Albrekt et al., 2014; Johansson et al., 2013; Johansson et al., 2011)

Der „Genomic Allergen Rapid Detection“ Test (Albrekt et al., 2014; Johansson et al., 2013) verwendet die Mutz-3-Zelllinie, die eine CD34-positive humane Vorläuferzelllinie dendritischer Zellen darstellt. Nach 24 h Exposition gegenüber insgesamt 20 sensibilisierenden und 20 nicht sensibilisierenden Testsubstanzen wurde von Johansson et al. (2013; 2011) die Genexpression von circa 200 Genen bestimmt und analysiert. Testkonzentrationen waren entweder Konzentrationen, welche mit maximal 10 % Zytotoxizität assoziiert war, bei nichttoxischen Substanzen 500 µM oder bei schwerlöslichen die höchste lösliche Konzentration. Anhand der substanzspezifischen Transkriptionsprofile konnte mittels eines speziellen Algorithmus (Support Vector Machine) das sensibilisierende Potenzial und auch

die Potenz bestimmt werden („Accuracy“ 99 %, Sensitivität 99 %, Spezifität 99 %), wobei zufällig ausgewählt 70 % der Substanzen als Trainingsset und 30 % als Testset dienen.

Dieser Test ist komplex und nicht für eine Verwendung im Rahmen dieses Projekts geeignet.

Laut Reisinger ist dies auch einer der priorisierten Tests für Testbatterie zur Wirkstärkenbewertung, entwickelt durch die „Cosmetics Europe Skin Tolerance Task Force“ (Reisinger et al., 2015), die Validierung ist derzeit andauernd (EC, 2015).

1.2.2.4.8 Weitere Tests für KE3 gemäß „Adverse outcome pathway“ (OECD, 2012a; b)

Takahashi et al. (2011) beschreibt den Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay). Dieser befindet sich bei japanischen Behörden (JaCVAM) in der Validierung und eine Entwurfsfassung einer OECD TG ist verfügbar (Stand 2016)⁷. Im Test wird die Cytokinexpression in dendritischen Zellen (THP-1) nach Substanzexposition gemessen. Die Validierung bezieht sich zunächst nur auf die Unterscheidung zwischen sensibilisierenden und nicht sensibilisierenden Chemikalien. Die „Accuracy“ der erzielten Vorhersagen beläuft sich bisher auf 80 % (86 % Sensitivität (92/107), 64 % Spezifität (23/36)).

1.2.2.5 T-Zellen-Aktivierung/Proliferation Allergen-spezifischer T-Zellen

1.2.2.5.1 Humaner T-Zell Priming Assay (hTCPA) (Richter et al., 2013)

Richter et al. (2013) beschreibt die Standardarbeitsanweisung (SOP) für diesen komplexen Test. Er ist verwandt mit dem CAATC-Assay (siehe Teilprojekt FP-0324). Es handelt sich dabei um einen Test, bei dem mononukleäre Zellen aus menschlichem Blut nach Exposition gegenüber einer Testsubstanz (als Antigen-präsentierende Zellen) zusammen mit naiven T-Zellen aus menschlichem Blut und Feeder-Zellen inkubiert werden. Nach 12 Tagen erfolgt eine Restimulation der T-Zellen mit modifizierten oder nicht modifizierten Monozyten und die TNF α - und die IFN γ -Produktion wird mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dieser Test muss mit einer negativen und positiven Kontrolle durchgeführt und mit dem Blut unterschiedlicher Donoren wiederholt werden. Eine positive Reaktion liegt entweder vor bei der Entstehung mindestens 20 CD4- oder CD8-positiver T-Zellen, welche TNF α - und/oder IFN γ -positiv sind, oder eine 3-fach höhere Häufigkeit dieser Zellen im Vergleich zur Restimulation mit nicht modifizierten Antigen-präsentierenden Zellen gegeben. Eine Wirkstärkenbewertung ist aktuell mit diesem Test nicht möglich, unter anderem auch weil die wirkstärkebestimmenden Parameter noch in der wissenschaftlichen Diskussion sind (Korrelation der sensibilisierenden Wirkstärke mit der Häufigkeit und der Vielfalt der vorhandenen T-Zell Rezeptoren noch unklar – ein starkes Allergen hat möglicherweise eine hohe Frequenz und weites TCR-Spektrum; weiterhin müssten wahrscheinlich die Anzahl und TCR-Rezeptor Vielfalt regulatorischer T-Zellen als modulierende Faktoren berücksichtigt werden). Einen ähnlichen Test entwickelte eine Arbeitsgruppe um Nicolas (Martin et al., 2010; Vocanson et al., 2014). Wegen der hohen Komplexität und der langen Versuchsdauer kann dieser Test im Rahmen dieses Projektes nicht verwendet werden, zudem steht eine Validierung noch aus.

⁷ OECD draft testing guideline http://www.oecd.org/env/ehs/testing/160721%20Draft-IL-8%20Luc%20TG_V3.pdf

1.2.2.5.2 *In vitro* skin explant test (Ahmed et al., 2016)

Für diesen Test wird gesunden Probanden peripheres Blut und zwei 4 mm dicke Hautbiopsien aus dem abdominalen Bereich entnommen (pro Chemikalie wurden mindestens 4 unterschiedliche Hautbiopsien untersucht). Mononukleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) wurden zu dendritischen Zellen differenziert (monocyte derived dendritic cells, MoDCs). Die MoDCs wurden stimuliert und die CD14⁻ Fraktion als autologe Lymphocyten im Test verwendet. Die Hautbiopsien wurden in *ex vivo* Medium kultiviert. Insgesamt wurde ein Testsets von 44 Substanzen (drei atemwegssensibilisierende Substanzen, vier Pre-/Prohaptene, 14 hautsensibilisierende Substanzen, 21 nicht sensibilisierende Substanzen und zwei Substanzen, die im LLNA falsch negativ identifiziert wurden) überprüft. Als Vortest wurden mittels TrypanBlau die zytotoxischen Eigenschaften einer Testchemikalie untersucht. Die Konzentration mit einer Zellviabilität von > 85 % wurde dabei als optimale Testkonzentration angesehen. Im eigentlichen „skin explant test“ wurden die kultivierte Hautproben für 24 h gegenüber den Testchemikalien exponiert. Anschließend folgte eine 4-tägige Co-Kultur mit den autologen Lymphocyten. Anschließend erfolgt eine Kultivierung über 3 Tage mit aktivierten Lymphocyten (d.h. Lymphocyten, nach dem Erstkontakt mit der Chemikalie). Es wurden in Paraffin gebettet Hautschnitte hergestellt und zwei unabhängige pathologische Bewertungen durchgeführt („grade 0, no observable damage to skin keratinocytes, grade I, displays mild vacuolization of basal cells, grade II, displays vacuolisation of basal cells and evidence of dyskeratotic bodies, grade III, displays sub-epidermal cleft formation at the dermal epidermal junction and grade IV, displays complete epidermal separation“ → Grade 0 und I entsprechen einem negativen Befund, wohingegen die Grade ≥ II positive Befunde darstellen). Weiterhin wurden die T-Zellantwort (Proliferation und TCR-Rezeptor Vielfalt), sowie die IFN γ Produktion gemessen. Ein beispielhaftes Ranking nach sensibilisierender Wirkstärke wurde zunächst an zwei Substanzen durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass bisher nur das histopathologische Rankingverfahren eine relative Unterscheidung erlaubt, die IFN γ Messung und die TCR Antwort sind nicht geeignet. Im vorliegenden Projekt findet die Methode keine Anwendung, da sie sich noch im experimentellen Entwicklungszustand befindet. Weitere Untersuchungen werden nötig sein für eine Verbesserung des Tests.

1.2.2.6 Fazit

Im vorliegenden Projekt wurden für mehre Substanzen der DPRA und der KeratinoSens™ durchgeführt. Die integrierte Bewertung der Ergebnisse soll eine Einordnung in die zwei unterschiedlichen Wirkstärkekategorien HS und GMS ermöglichen. Details der projektspezifischen Testung sind im Kapitel „ARBEITSSCHRITT 5: ZUSÄTZLICHE *IN VITRO* TESTUNGEN“ gezeigt und diskutiert. Die aufgeführten Tests wurden im Projekt angewandt, da sie im Vergleich zu anderen Methoden bereits validiert sind. Eine regulatorische Akzeptanz ist demnach wahrscheinlich. Zudem wurde Ihre generelle Eignung für die zu untersuchenden Stoffe bereits gezeigt.

Es bleibt allerdings anzumerken, dass bisher keines der Testsysteme für eine Wirkstärkenbewertung formal validiert ist. Aktuell als vielversprechend wird jedoch neben einer Kombination aus den validierten *in vitro* Tests (DPRA/KeratinoSens™/h-CLAT, siehe dazu auch 1.3) vor allem die Kombination aus NCTC2544 IL-18 Test und einem EE-Tests (siehe 1.2.2.3.1) oder der SENS-IS Test (siehe 1.2.2.3.4) angesehen.

1.2.3 *in silico* Methoden

Im Vorläuferprojekt wurden verschiedene (Q)SAR Modelle bzw. Expertensysteme auf ihre Eignung überprüft und die Ergebnisse in einer kurzen Form dargestellt. Eine sehr gute Übersicht aktueller Ansätze bietet ebenfalls Ezendam et al. (2016). Im aktuellen Projekt werden neu veröffentlichte Modelle und (teilweise bereits bekannte) *in silico* Plattformen knapp besprochen. Die aktualisierte Entwurfsfassung der endpunktspezifischen Leitlinie der ECHA („Draft guidance IR&CSA R.7a“, Juni 2016) liefert zudem einen guten Überblick (siehe auch <http://www.antaes-life.eu/index.php?sec=modellist>). Hauptaugenmerk wird dabei auf eine freie Verfügbarkeit der Modelle/Anwendungsplattformen gelegt.

1.2.3.1 VEGA (früher CAESAR)

Das CAESAR Modell wurden in eine neue Plattform namens VEGA (Benfenati et al., 2013)⁸ integriert. Die zugrunde liegenden Algorithmen wurden aktualisiert (Version 2.1.6). Letztlich kann aber, wie bereits zuvor festgestellt, das Modell nicht für eine Wirkstärkenbeurteilung herangezogen werden, da die Auswertung nur in den Kategorien „sensibilisierend“ versus „nicht sensibilisierend“ bzw. „Einstufung ungewiss“ erfolgt.

1.2.3.2 QSAR Toolbox (OECD, 2016b)

Zwischenzeitlich erfolgten einige Aktualisierungen der QSAR Toolbox, die unter anderem den Endpunkt Sensibilisierung betreffen (hier QSAR Toolbox v3.4 beschrieben, teilweise erfolgten Auswertungen aber bereits mit der Vorgängerversion QSAR Toolbox v3.3.5).

Eine Übersicht der nun möglichen Auswertungen soll hier knapp geschildert werden.

- *In vivo* Datenrecherche

Folgende Datenbanken sind verfügbar und wurden für das vorliegende Projekt durchsucht:

- Skin sensitisation (1242 Chemikalien gesammelt aus zwei unterschiedlichen Quellen, hauptsächlich LLNA und GPMT Daten; teilweise quantitative Auswertung durchgeführt; Stand Juni 2016)
- Skin sensitisation ECETOC (39 Chemikalien, Stand Juli 2014)

Die veröffentlichte Primärliteratur bzw. mittlerweile öffentlich zugängliche Ergebnisse aus den Registrierungs dossiers wurden bereits über die substanzspezifische Literatursuche identifiziert.

- *In chemico* Datenrecherche

Weiterhin kann die bereits bekannte Datenbank, in der Messungen der Thiol-Reaktivität hinterlegt sind, durchsucht werden. Zudem findet sich nun aber auch noch eine weitere Datenbank in der andere Peptidreaktivitätsdaten enthalten sind.

- GSH Experimental RC50 (1469 Chemikalien, Stand Juni 2016; Messung der Thiol-Reaktivität)
- Chemical Reactivity COLIPA (359 Chemikalien, Stand Juni 2016; % Cystein Depletion, % Lysin Depletion und Adduktbildung)

⁸ <http://www.vega-qsar.eu/index.php>

Es liegen jedoch keine relevanten Ergebnisse für Inhaltsstoffe von Epoxidharzkomponenten vor.

- Profiling auf Basis der chemischen Reaktivität

Weitere Module zur Abschätzung der Peptidreaktivität und des voraussichtlichen Proteinbindungsmechanismus können herangezogen werden. Folgende Profiler liefern eine solche mechanistische Reaktivitätsdomäne auf Basis von Strukturhinweisen:

- Protein Binding by OASIS (146 Kategorien)
- Protein binding by OECD (102 Kategorien)
- Protein binding potency (90 Kategorien)
- DPRA Cysteine peptide depletion (32 Kategorien)
- DPRA Lysine peptide depletion (24 Kategorien)
- Keratinocyte gene expression (22 Kategorien)
- Protein binding alerts for skin sensitization by OASIS v1.4 (102 Kategorien, masking included)
- Respiratory sensitization (41 Kategorien)

Ein Modul zur Simulation des potentiellen Metabolismus in der Haut kann auf die zu untersuchenden Substanzen angewandt werden (Dimitrov et al., 2005). Weiterhin stehen zwei Module zur Überprüfung der Autooxidation (Autoxidation simulator (alkaline medium); Prehaptene) zur Verfügung.

- Anwendung der Implementation des „Adverse outcome pathway“ (OECD, 2012a; b)

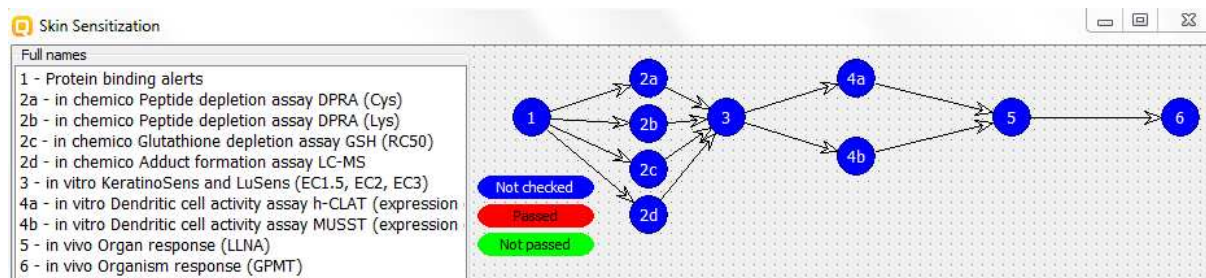


Abbildung 6 Abbildung des Moduls “The adverse outcome pathway for skin sensitisation elicited by covalent binding to proteins” aus der QSAR Toolbox (September 2016)

Für jeden Stoff mit eindeutiger Identifikation bzw. Struktur kann innerhalb der QSAR Toolbox in systematischer Abfolge die Information aus den unterschiedlichen Modulen innerhalb des Adverse outcome pathways abgeprüft werden.

- Kategoriebildung und Datenübertragung (Read-across)

Beschreibung siehe FP-0324. Im vorliegenden Projekt nicht weiter verfolgt.

Fazit: Die detaillierte Auswertung aller Inhaltsstoffe von Epoxidharzinhaltsstoffen (z.B. Durchführung des „Adverse outcome pathway“ (AOP)-Moduls) ist im zeitlichen Rahmen des Projekts nicht möglich. Insgesamt wurde für die neu zu bewertenden Inhaltsstoffe, die *in vivo*, *in vitro* und *in chemico* Datenrecherche, sowie das Profiling für die jeweilige Substanz durchgeführt (ohne Metaboliten, außer es wurde für den Inhaltsstoff selbst keine direkte Proteinreaktivität identifiziert).

1.2.3.3 Dancik

Von Dancik et al. (2013) wurde ein PBPK-Modell der Haut entwickelt, um mittels physikalisch-chemischer Parameter und weiterer Moleküleigenschaften die Hautpermeabilität abzuschätzen. Dieses Modell ist als „open source“-Programm verfügbar⁹ und würde sich deshalb prinzipiell für eine Verwendung im Rahmen dieses Projektes anbieten.

Es zeigt sich allerdings, dass für mehrere der als Testsubstanzen ausgewählten Verbindungen (z.B. DDT, Triclosan, Malathion) das Modell deutliche Unter- oder Überschätzungen der experimentell gemessenen Werte ausgibt: bei verschiedenen Expositionsszenarien differierten nur 42-54 % der vorhergesagten Werte für die systemisch absorbierte Menge um einen Faktor ≤ 3 von den experimentellen Werten. Insofern scheint das Modell noch nicht ausreichend abgesichert, um eine valide *in silico* Schätzung der Hautpenetration vorzunehmen. Das Modell war Teil der ITS-2 von Jaworska und Kollegen (Jaworska et al., 2013; Pirone et al., 2014), wurde aber auf Basis besserer Alternativen in der neueren Version ITS-3 (siehe 1.3.2 und 6) nicht berücksichtigt. Eine Anwendung im vorliegenden Projekt scheint demnach wenig aussagekräftig, zumal die Korrelation der Hautpenetration auf die sensibilisierende Wirkstärke fraglich ist (siehe 1.2.2.1.1).

1.2.3.4 Enoch und Roberts

Enoch and Roberts (Enoch und Roberts, 2013) entwickelten ein quantitatives mechanistisches Modell (QMM) zur Vorhersage der sensibilisierenden Potenz auf Basis von 2 quantenmechanischen Deskriptoren der Michael Addition, welche als Maß für die Aktivierungsenergie dieser Substanzklasse stehen. Als Anwendungsdomäne wurde festgelegt: direkte Michael-Akzeptoren mit einer Bindungsstelle, Alkene und Alkine (azyklisch oder zyklisch), welche durch Aldehyd-, Keton-, Ester- oder Cyanogruppen oder durch aromatische Ringe polarisiert sind. Nachdem flüchtige Substanzen und rasch polymerisierende Substanzen außerhalb der Anwendungsdomäne liegen, ist dieses Struktur-Wirkungsmodell möglicherweise für ausgewählte Komponenten von Epoxidharzen (Monomere vor Vermischung) geeignet.

1.2.3.5 Nandy

Ein von Nandy et al. (2013) entwickeltes regressions-basiertes QSAR-Modell beinhaltet mehrere Struktur- und quantenmechanischen Deskriptoren (funktionale, elektronische, thermodynamische und topologische molekülspezifische Parameter), mit Festlegung von Anwendungsdomänen für diese Größen. 13 bzw. 14 Substanzen wurden jeweils für 2 verschiedene QSAR-Modelle als Testverbindungen gewählt, 37 bzw. 38 als Trainingsset. Dieses Modell zeigte mit Vorhersagen für EC3 Werte im LLNA, dass aromatische Verbindungen stärker hautsensibilisierend wirken sollen als aliphatische (mit Ausnahme von Substanzen mit Carbonylfunktionen) und dass Elektrophilie und Hydrophilie die sensibilisierende Wirkung abschwächen. Zur jetzigen Zeit kann das QSAR-Modell bei der schmalen Datenbasis nicht verwendet werden. Die Zukunft wird zeigen, ob das Modell auch bei verbreedeter Datenbasis realistische Potenzabschätzungen sensibilisierender Verbindungen liefert.

⁹ <http://www.cdc.gov/niosh/topics/skin/finiteSkinPermCalc.html> Abfrage Juli 2015

1.2.3.6 Fazit

Im vorliegenden Projekt fanden folgende *in silico* Modelle Anwendung:

- log $K_{O/W}$ Bestimmung mittels KOWWIN v1.68 Modell ausgeführt in QSAR Toolbox
- Permeabilitätskoeffizient (K_p) Bestimmung mittels DERMWIN v2.02 ausgeführt in EPI Suite™
- *In vivo* und *in chemico* Datenrecherche, sowie mechanistisches Profiling in der QSAR Toolbox
- Mechanistisches Profiling in Toxtree („Skin sensitisation reactivity domains“; vergleiche Beschreibung im Vorgängerprojekt FP-0324)
- Anwendung des computergestützten Bayes-Netzwerk nach Jaworska et al. (2015) (Details zur Methodik siehe 1.3.2)

Die ermittelten Ergebnisse sind jeweils substanzspezifisch diskutiert und im Fall der ITS nach Jaworska findet sich eine übergreifende Diskussion in Kapitel 6.

1.3 Integrierte Teststrategien (ITS)

In Basketter et al. (2013) wird eine allgemeine ITS beschrieben. Generell sollten nach Ansicht der Experten Tests zu mindestens drei unterschiedlichen „Key Events“ des „Adverse outcome pathways“ (AOP) Daten vorhanden sein und in einem „Weight of Evidence“ (WoE) Ansatz bewertet werden. Ob eine Substanz letztlich als sensibilisierend zu bewerten sei, sollte auch *in silico* und andere, nicht standardisierte Daten miteinbeziehen (aus diesem Grund wird mittlerweile anstelle des Begriffs ITS bevorzugt die Abkürzung IATA – „Integrated Approaches to Testing and Assessment“ – um den Nicht-Testmethoden mehr Gewicht zu verleihen)¹⁰. Die Autoren merken an, dass in Fachkreisen noch eine breite Mehrheit der Ansicht ist, dass *in vitro* Modelle derzeit den LLNA noch nicht vollständig ersetzen können. In gleichem Sinne äußern sich Basketter und Casati (2014). Im Workshopbericht einer späteren Expertentagungen wurde dieser generische ITS Ansatz bestätigt und erste Fallstudien präsentiert (Basketter et al., 2015).

Die OECD arbeitet aktuell an der Fertigstellung eines neuen Leitfadens zur „Weight of Evidence“ (WoE) Betrachtung aller verfügbaren Daten für den Endpunkt Hautsensibilisierung¹¹. Im Anhang 1 dieses Leitfadens sollen 12 Fallstudien diskutiert werden, die von unterschiedlichen Gruppen als integrierte Teststrategien zur Bewertung vorgeschlagen werden (jedoch teilweise unterschiedliche Ziele verfolgen, d.h. Gefahrenidentifikation und/oder Wirkstärkenbewertung) und teilweise bereits Eingang in verschiedene Veröffentlichungen fanden (siehe Tabelle 2). Eine sehr gute Übersicht aktueller Ansätze bietet ebenfalls Ezendam et al. (2016).

¹⁰ STS (sequential testing strategy) ebenfalls gebräuchlich; Definition laut OECD „ ITS and STS are so-called defined approaches to testing and assessment, which use a fixed data interpretation procedure (DIP) that is applied to data generated with a defined set of individual information sources. In contrast, an IATA follows an iterative process of information collection and the data gathered targets the generation of new data, when needed. The decision-making in an IATA is based on a weight-of-evidence approach.“

¹¹ 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-ENV/JM/HA(2016)11, vorgestellt von Silvia Casati im continuous education course bei der Eurotox2016 oder ähnlich zu finden unter http://cefic-lri.org/wp-content/uploads/2014/03/D-ECHA-Ws-2015_Casati.pdf

Tabelle 2 Fallstudien aus dem OECD Leitfaden zur WoE Bewertung von Daten zur Hautsensibilisierung

	Fallstudie	Ziel	Publikationen
1 BASF	An Adverse Outcome Pathway-based "2 out of 3" integrated testing strategy approach to skin hazard identification	Gefahren-identifikation	(Bauch et al., 2012; Ramirez et al., 2014; Urbisch et al., 2015)
2 RIVM	Sequential Testing Strategy (STS) for hazard identification of skin sensitizers	Gefahren-identifikation	(van der Veen et al., 2014)
3 G. Patlewicz	A non-testing Pipeline approach for skin sensitisation	Gefahren-identifikation	(Patlewicz et al., 2014)
4 L'Oréal	Stacking meta-model for skin sensitisation hazard identification	Gefahren-identifikation	(Gomes et al., 2013)
5 ICCVAM	Integrated decision strategy for skin sensitisation hazard	Gefahren-identifikation	(Strickland et al., 2016a) (Strickland et al., 2016b)
6 EC- JRC	Consensus of classification trees for skin sensitisation hazard prediction	Gefahren-identifikation	(Asturiol et al., 2016)
7 Givaudan	Sensitizer potency prediction based on Key event 1 + 2: Combination of kinetic peptide reactivity data and KeratinoSens® data	Wirkstärken-bewertung	(Natsch et al., 2015)
8 Shiseido	The artificial neural network model for predicting LLNA EC3 (iSENS ver. 2)	Wirkstärken-bewertung	(Tsujita-Inoue et al., 2015; Tsujita-Inoue et al., 2014)
9 P&G	Bayesian Network DIP (BN-ITS-3) for hazard and potency identification of skin sensitizers	Wirkstärken-bewertung	(Jaworska et al., 2015)
10 Kao Corporation	Sequential testing strategy (STS) for sensitising potency classification based on <i>in chemico</i> and <i>in vitro</i> data	Wirkstärken-bewertung	(Takenouchi et al., 2015)
11 Kao Corporation	Integrated testing strategy (ITS) for sensitising potency classification based on <i>in silico</i> , <i>in chemico</i> , and <i>in vitro</i> data	Wirkstärken-bewertung	(Takenouchi et al., 2015) (plus DEREK)
12 Unilever	DIP for skin allergy risk assessment (SARA)	Wirkstärken-bewertung	(MacKey et al., 2013; Maxwell et al., 2012; Maxwell et al., 2014)

Die nachfolgende Tabelle 3 zeigt, dass die vorgeschlagenen ITS-Ansätze unterschiedlich umfangreich sind. Die detaillierte Tabelle enthält Informationen welche „Key events“ (KE) des AOP und welche anderen Daten Eingang in die jeweilige ITS finden. Im Anschluss an die Tabelle finden sich kurze Darstellungen wesentlicher Informationen zu einigen (aber nicht allen) Ansätzen. Auf eine detaillierte Diskussion aller ITS wird verzichtet, da im Rahmen dieses Projekts aufgrund der technischen und finanziellen Möglichkeiten der Umfang der neu durchzuführenden Testungen bereits deutlich umrissen ist.

Tabelle 3 **Detailansicht verschiedener ITS/STS/IATA Ansätze**

Autor	<i>In vitro</i> Testbatterie					<i>in silico</i> Verfahren	Zyto-toxizität	Quanti-tative Aussage
	Bioverfügbarkeit/ Penetration	Hapteni-sierung	Keratinocyten-aktivierung	Reifung/ Migration dendritischer Zellen	T-Zell-reaktion			
(Basketter et al., 2013)		x	x	x				-
(Bauch et al., 2012)	x	x	x / x	x / x		x	x	-
(Guyard-Nicodème et al., 2015)	x	x	x				x	-
(Hirota et al., 2015)		x	x	x / x				+
(Jaworska et al., 2013; 2015; Pirone et al., 2014)	x	x	x	x		x		+
(Luechtefeld et al., 2015)						x		+
(Natsch et al., 2013)		x	x	x / x				-
(Natsch et al., 2015)		x	x					+
(Nukada et al., 2013)		x		x		x		+
(Ramirez et al., 2014)		x	x / x	x / x				-
(Rovida et al., 2015)	x	x	x	x	x			-
(Takenouchi et al., 2015)		X		x		x		+
(Tsujita-Inoue et al., 2015; Tsujita-Inoue et al., 2014)	x		x	x / x		x		+
(Urbisch et al., 2015)		x	x	x				-
(van der Veen et al., 2014)		x	x / x	x		x		-

x/x zwei verschiedene Test werden genutzt um ein KE abzu prüfen

1.3.1 Ansätze zur Bewertung des sensibilisierenden Potentials

Der ITS-Ansatz der BASF wurde in verschiedenen Veröffentlichungen und Beiträgen auf Expertentagungen vorgestellt und über die Zeit weiterentwickelt. Das Ziel dieser ITS ist die Gefahrenidentifikation, eine quantitative Aussage zur Wirkstärke ist nicht vorgesehen.

Bei Bauch et al. (2012) sind zwei „Key events“ des AOP doppelt mit *in vitro* Tests abgedeckt (Keratinocytenreaktion, Aktivierung dendritischer Zellen). Mit dieser ITS wurden 54 Substanzen getestet und ein Vorhersagemodell (Prediction model) entwickelt. Das Modell stellt anhand der experimentellen Daten zu korrekter Vorhersage, falsch positiven oder falsch negativen Resultaten folgende Regeln auf:

- wenn DPRA und einer der Keratinocytenaktivierungstests negative Resultate liefern, ist die Substanz als nicht sensibilisierend anzusehen.
- Wenn der MUSST positiv ausfällt, ist die Substanz als sensibilisierend zu betrachten.
- Wenn die Ergebnisse aus den 3 Tests widersprüchlich sind, oder statt des MUSST der h-CLAT verwendet wurde, gilt, dass 2 von 3 Tests (also positiv oder negativ) das Vorhersageergebnis bestimmen.

Nach dem Vorhersagemodell (2 aus 3) ergab sich sowohl für die Kombination DPRA/LuSens/MUSST als auch für DPRA/KeratinoSensTM/MUSST eine „Accuracy“ von 94 % zu Humandaten und von 83 % zu LLNA-Ergebnissen. Die Vorhersagen der OECD-Toolbox mit einer „Accuracy“ von 80 % sind nach Ansicht der Autoren eher für ein Eingangsscreening geeignet. Als großen Nachteil der *in vitro* Methoden sehen Bauch et al. (2012) die Probleme bei Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit, da Präzipitation die Versuchsergebnisse verfälscht. Assays mit Luft/Flüssigkeits-Interphasen wären bei solchen Substanzen besser geeignet. Mit weiteren Substanzen ergaben sich leicht veränderte Qualitätsmaßzahlen: 27 Substanzen (total 35, ohne Polymere und Formulierungen) ergab sich qualitativ eine „Accuracy“ von 89 %, eine Sensitivität von 88 % und eine Spezifität von 91 % zu LLNA-Ergebnissen (Posterpräsentation Kolle, 2013¹²). Ramirez et al., (2014) untersuchten 74 Substanzen mit dem LuSens-Assay und kombinierten die Ergebnisse mit bereits veröffentlichten Daten des DPRA, MUSST und h-CLAT (insgesamt 50 Datensätze). Die Auswertung erfolgte vergleichbar wie bei Bauch et al. (2012) mit dem WoE-Ansatz. Dabei zeigte sich, dass die Kombinationen von 1) DPRA, 2) KeratinoSensTM oder LuSens und 3) MUSST oder h-CLAT zu ähnlichen Ergebnissen führten. Die „Accuracy“ zu Humandaten betrug 86-90 %, die Sensitivität 82-89 % und die Spezifität 82-100 %. Zum LLNA waren die Werte für „Accuracy“ 81-83 %, für Sensitivität 75-83 % und für Spezifität 82-94 %. Die neueste Publikation für diese ITS stellt Urbisch et al. (2015) dar. Der „2 aus 3“-Ansatz des Vorhersagemodells lieferte bei einem 213 Substanzen umfassenden Datensatz (DPRA, KeratinoSensTM, LuSens, h-CLAT, (m)MUSST) eine „Accuracy“ von 90 % im Vergleich zu Humandaten und 79 % im Vergleich zu Ergebnissen aus dem LLNA. Der Datensatz wurde zudem herangezogen um mechanistische Domänen für eine mögliche Proteinbindung zu definieren.

Bei der ITS von Natsch et al. (2013) wurden DPRA, KeratinoSensTM, MUSST und h-CLAT kombiniert. Somit ist die Aktivierung dendritischer Zellen mit zwei Tests abgedeckt. Ähnlich der Verfahrensweise von Bauch et al. (2012) verwenden die Autoren einen „Weight of

¹² 18th European Congress on Alternatives to Animal Testing, September 2013. Linz, Österreich

Evidence“ (WoE)-Ansatz, bei dem bei widersprüchlichen Ergebnissen die Resultate von 2 aus 3 Tests den Ausschlag für eine positive oder negative Einschätzung geben. Auf Basis von 145 Substanzen ergab dieser WOE-Ansatz eine „Accuracy“ für eine qualitativ richtige Aussage von 81 %, bei einer Sensitivität von 82 % und einer Spezifität von 77 % zu LLNA-Ergebnissen.

Eine von van der Veen et al. (2014) und Rorije et al. (2013) entwickelte ITS stellt eine abgestufte Strategie dar, bei der initial die Aussagen verschiedener *in silico* Modelle (u.a. DEREK, OECD Toolbox) mittels einer Bayes'schen Statistik verknüpft werden. Je nach Ergebnis werden die Ergebnisse weiterer Tests einbezogen, siehe Abbildung 7. In Tier2 wird dabei bei einem positiven Ergebnis bei der Peptidbindung ein KeratinoSens™ durchgeführt, da er die wenigsten falsch positiven Ergebnisse aufweist. Im Fall eines negativen ersten Ergebnisses wird ein Gensignatur-Test durchgeführt, da er die wenigsten falsch negativen Ergebnisse aufweist. Der hier verwendete Gensignatur-Assay ist in Abschnitt 1.2.2.3.5 beschrieben.

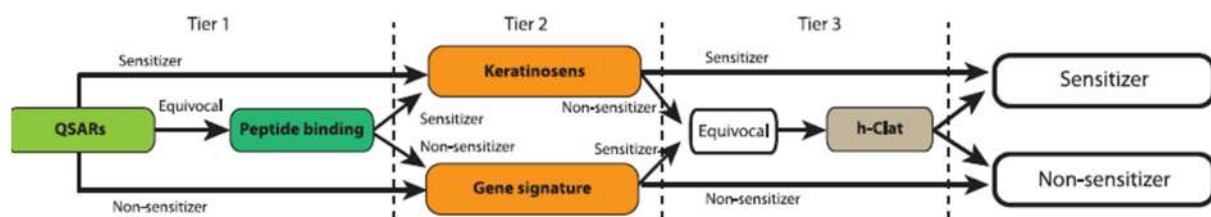


Abbildung 7: Gestufte Teststrategie von van der Veen et al. (2014)

Mittels dieser abgestuften Strategie wurden an einem Set von 41 Substanzen „Accuracy“-Werte von 92,7 % (Tier 1); 100 % (Tier 2, keine Vorhersage für 10 Substanzen möglich) und 100 % (Tier 3, keine Vorhersage für 2 Substanzen möglich) in Bezug auf Humandaten erreicht. Damit scheint dieses Verfahren eine sehr hohe Treffgenauigkeit zu erzielen, jedoch erlaubt es nur qualitative Aussagen.

Die IATA vorgestellt von Patlewicz et al. (2014) soll als Modul in die OECD Toolbox Eingang finden (Ezendam et al., 2016). Dies würde die Anwendbarkeit deutlich vereinfachen, da die IATA aber wiederum nur eine qualitative Aussage erlaubt werden keine weiteren Details ausgeführt.

Guyard-Nicodème et al. (2015) verglichen eine *in vitro* ITS mit Ergebnissen aus folgenden *in vivo* Tests: Local Lymph Node Assay (LLNA), Meerscheinchens-Maximierungstest (GPMT) und Human Patch Test (HPT). Die *in vivo* Ergebnisse wurden dabei klassiert in nicht sensibilisierend (0), weak (W), moderate (M), well demonstrated (S), strong (St) or extreme (E). Allerdings wurden die Bedingungen für diese Kategorisierung von den Autoren nicht angegeben. Die Ergebnisse der verwendeten *in vitro* Tests (Resorption, Haptenisierung, IL-18-Induktion in NCTC2544 humanen Keratinozyten und akute Zytotoxizität im MTT-Test) wurden für die Einzeltests in hoch, mittel und niedrig kategorisiert, zum Vergleich mit den *in vivo* Daten allerdings nur noch als positiv und negativ gewertet (Guyard-Nicodème et al., 2015). Insofern bietet diese Publikation keinen verwertbaren quantitativen Ansatz.

Rovida et al. (2015) stellt die Zusammenfassung eines mit internationalen Experten besetzten Workshops dar. Es wird in einer allgemeinen ITS zusätzlich zu den in Tabelle 3 gelisteten Assays noch ein spezifischer Test auf T-Zellfunktion vorgeschlagen, der Human T cell priming assay (hTCPA) von Richter et al. ((2013), siehe Abschnitt 1.2.2.5.1). Konkrete Auswertungen zur „Accuracy“ dieses Ansatzes wurden nicht durchgeführt. Ähnlich generell wird bei Reisinger et al. (2015) das Vorgehen der „Cosmetics Europe Skin Tolerance Task Force“

beschrieben – ähnliche Tests mit etwas anderer Priorität werden beschrieben und in einer generellen ITS zur Verwendung vorgeschlagen.

1.3.2 Ansätze zur Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke

Natsch et al. (2015) führten mit Ergebnissen aus DPRA und KeratinoSens™ eine Multiple Regressionsanalyse gegenüber LLNA-Ergebnissen durch, wobei die untersuchten Substanzen in einer Teilauswertung noch in chemische Klassen gruppiert wurden (kombinierte globale und Domänenbewertung; Eingangsdaten: K_{norm} Reaktionskonstante für Peptidreaktivität, VP Dampfdruck und EC1,5 und IC50 aus dem KeratinoSens™). Das Modell zur Wirkstärkenbewertung zeigt bei Vergleich mit Humandaten eine Treffgenauigkeit von 82 % für beide Wirkstärkeklassen nach CLP. Werden die Vorhersagen mit experimentellen LLNA Ergebnissen verglichen so ergibt sich für die Unterkategorie 1A eine Treffgenauigkeit von 70 % und für die Unterkategorie 1B von 77 % (1A entspricht hoher Sensibilisierungsstärke, LLNA EC3 \leq 2 %; 1B entspricht geringer bis mäßiger Sensibilisierungsstärke, LLNA EC3 $>$ 2 %; EU, 2011). Dieser Algorithmus liefert demnach quantitative Aussagen zur Wirkstärke (LLN und human), scheint im Rahmen dieses Projektes zu komplex für eine Verwendung. Außerdem entspricht die Kategorisierung nicht den Grenzen des im Projekt angewandten Rankingmodells, sodass eine Anwendung schwierig scheint.

Hirota et al. (2015) werteten die Befunde der Einzeltests mittels „Artificial Neural Network“ (ANN)-Analyse aus, bei dem die Versuchsergebnisse gewichtet in die Bewertung eingehen. Tsujita-Inoue et al. (2014) verwenden eine weiterentwickelte ANN-Version (iSENS ver2). Und in Tsujita-Inoue et al. (2015) werden zudem noch weitere Deskriptoren für die 3D-Molekülstruktur miteinbezogen. Die Aussagen zur Wirkstärke erfolgen immer korreliert zu den Wirkstärkekategorien aus dem LLNA (extrem, stark, moderat, schwach, nicht sensibilisierend; ECETOC, 2003). Der EC3 Wert = 1 % wird dabei als cut-off Wert zwischen extrem/stark und moderat/schwach sensibilisierenden Chemikalien herangezogen. Dabei ergibt sich für die 62 überprüften Testchemikalien eine Treffgenauigkeit von 92 % für die Kategorie extrem/stark und 72 % für die Kategorie moderat/schwach (Tsujita-Inoue et al., 2014). Der komplexe Algorithmus steht uns nicht zur Verfügung, insofern kann dieser Ansatz nicht weiter diskutiert werden. Enthaltene *in vitro* Ergebnisse bzw. *in silico* Vorhersagen werden stoffspezifisch (siehe Kapitel 3) berichtet.

Die ITS der Firma Procter & Gamble umfasste sowohl *in vitro* als auch *in silico* Daten (TIMES), welche mittels eines Bayes'schen Netzes für eine quantitative Gesamtaussage verknüpft werden. Vorhergesagt werden soll dabei die Potenz einer Chemikalie im LLNA. Nach einer Machbarkeitsstudie (Jaworska et al., 2011) wurde 2013 eine verbesserte und im Praxistest erprobte ITS-2 veröffentlicht (Jaworska et al., 2013). Später wurde die ITS-2 nochmals modifiziert (Einbindung eines Bioverfügbarkeitsmodells, (Dancik et al., 2013)) und als „open source“ zur Verfügung gestellt (Pirone et al., 2014). Die neueste ITS-3 wurde nochmals grundlegend modifiziert um chemisch- und biologisch-mechanistische Zusammenhänge besser widerzuspiegeln (Jaworska et al., 2015). Als Eingangsdaten dienen nun Variablen zur Bioverfügbarkeit, die *in silico* TIMES-SS Wirkstärkenvorhersage (Kat 1 = nicht, Kat 2 = schwach, Kat 3 = stark sensibilisierend) und quantitative Messwerte des DPRA, KeratinoSens™ und h-CLAT. Vorhersagen werden getroffen als Wahrscheinlichkeit mit der eine Substanz in eine bestimmte Wirkstärkekategorie (LLNA, EC3 $<$ 1 % stark, 1-10 % moderat, 10-100 % schwach, nicht sensibilisierend; Kimber et al., 2003) fällt. Die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Wirkstärkekategorie wird zudem als „Bayes Faktor“ (BF)

ausgedrückt. Eine Substanz gehört mit höherer Wahrscheinlichkeit zu einer bestimmten Wirkstärkekategorie je höher der entsprechende BF. Die Interpretation eines BF im Bezug auf die Akzeptanz der Vorhersage findet sich in Tabelle 4.

Tabelle 4 Bayes Faktor – Interpretation der Hinweisstärke

Bayes Faktor (BF)	Beweiskraft zur Akzeptanz der Vorhersage
< 1	Negativ (Alternative wird befürwortet)
1 – 3	Kaum erwähnenswert (schwacher Hinweis)
3 – 10	Deutlicher Hinweis
> 30	Starker Hinweis

Die erzielten Vorhersagen liefern eine hohe Treffgenauigkeit für die Vorhersage von stark und schwach sensibilisierenden Substanzen (87-89 %), wohingegen die als moderat einzustufenden Substanzen weniger gut vorherzusagen waren („accuracy“ 75 %). Als Nachteil dieser Methodik führen Natsch und Emter (2015) aber eben diese Diskretisierung der Daten in Wirkstärkeklassen. Es kommt zum Datenverlust und es erfolgt keine Aussage in kontinuierliche Zahlen bezüglich der Zielvariable (LLNA EC3). Die probabilistische Auswertung ist komplex und in diesem Rahmen von uns nicht durchführbar. Deshalb wurden die Autoren angefragt, ob eine Auswertung für ausgewählte, im Rahmen dieses Projekts relevante Substanzen möglich ist, Die Ergebnisse dieser Zusammenarbeit sind in Abschnitt 6 berichtet.

Die Firmengruppe Kao entwickelte ebenfalls verschiedene Ansätze zur Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke. Die Ergebnisse liegen in Veröffentlichungen vor (Nukada et al., 2013; Takenouchi et al., 2015). Dabei wurden zwei Möglichkeiten ausgewertet – a) eine Kombination von drei Methoden (ITS) und b) eine sequentielle Teststrategie (STS). Da beide Veröffentlichungen ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Vorhersagegenauigkeit machen werden nur die Ergebnisse der neuesten Studie referiert.

Die ITS von beinhaltet die Testergebnisse des DPRA, h-CLAT und der *in silico* DEREK-Analyse. Es handelt sich um Punkte-Methode (score-based), dabei wurde für die experimentellen Daten eine Wirkstärken-Klassifizierung von 0-3 gewählt, für die *in silico* Ergebnisse lediglich eine positiv/negativ (0/1) Unterscheidung. Die Einteilung der Wirkstärkeklassen beim h-CLAT wurde anhand der minimalen Induktionsdosis (MIT) getroffen, mit einer MIT von $\leq 10 \mu\text{g/ml}$ entspricht dabei einem stark sensibilisierenden Stoff, MIT von $> 10 \leq 150$ bzw. $> 150 \leq 5000 \mu\text{g/ml}$ werden als moderat bzw. schwach sensibilisierend gewertet. Beim DPRA orientiert sich die Einordnung an den in der OECD TG 442C gegebenen Grenzen (siehe 1.2.2.2.1). Dem maximal möglichen Wert von 7 wurde eine stark sensibilisierende Wirkung zugeordnet, Werte von 2-6 wurden als schwach sensibilisierend bewertet, 0-1 als negativ. Für eine qualitative Aussage ergab sich auf Basis von 139 Substanzen für die ITS eine „Accuracy“ von 84 % zu LLNA-Ergebnissen (cut-off LLNA EC3 > 1 % moderat/schwach sensibilisierend, EC3 < 1 % schwach sensibilisierend). Bei quantitativer Auswertung lag der entsprechende Wert bei 71 % (Takenouchi et al., 2015).

Zur Verbesserung der Treffgenauigkeit wurde anschließend eine sequenzielle Teststrategie (STS) verwendet, bei der der h-CLAT als erste Analyse angewandt wird (höhere „Accuracy“ als der DPRA). Die Auswertung des h-CLAT erfolgte dabei nur in zwei Kategorien – eine MIT

von $\leq 10 \mu\text{g/ml}$ charakterisiert eine stark sensibilisierende Substanz und eine $> 10 \leq 5000 \mu\text{g/ml}$ wird als schwach sensibilisierend gewertet. Nur falls der h-CLAT negativ ausfiel, wurde der DPRA im zweiten Schritt mit einbezogen und bei positivem Resultat die Substanz als schwach sensibilisierend gewertet. Negative Ergebnisse in beiden Tests führten zur Bewertung als nichtsensibilisierend. Aus diesem Verfahren resultierte eine „Accuracy“ von 81 % für die qualitative und 69 % für die quantitative Übereinstimmung zu LLNA-Ergebnissen. Nachdem sich gezeigt hatte, dass Substanzen mit $\log K_{O/W} > 3,5$ im h-CLAT falsch negative Resultate produzieren können (Takenouchi et al. (2015), vgl. auch OECD TG 442E, Abschnitt 1.2.2.4.2), wurden diese bei der Auswertung ausgeschlossen. Es ergab sich für die ITS auf Basis von 128 Testsubstanzen eine „Accuracy“ von 89 % (qualitativ) bzw. 74 % (quantitativ) zu LLNA-Ergebnissen. Für die STS waren die entsprechenden Werte 85 % und 73 %. Allerdings ist die Spezifität (Richtig-Negativ-Rate) der STS zur Gefahrenerkennung immer noch sehr gering (51 %). Damit zeigt sich, dass beide Strategien zu sehr ähnlichen Treffergenauigkeiten führen.

Luechtefeld et al. (2015) führten eine *in silico* Analyse von Daten aus verschiedenen *in vitro* Assays (DPRA, KeratinoSensTM oder ähnliche Assays, jedoch mindestens sieben Deskriptoren). Für die Potenzbewertung wurde ein „dose-informed random forest“ Algorithmus mit einem „hidden Markov“ Modell kombiniert. Diese Modellierung ist komplex und nicht öffentlich zugänglich, dementsprechend kann im vorliegenden Projekt keine Auswertung erfolgen.

1.3.3 Fazit

Zum jetzigen Zeitpunkt liegen verschieden Fallstudien für die integrierte Datenbewertung vor. Auch wenn einige der veröffentlichten ITS vielversprechende Ansätze für eine auch quantitative Bewertung der sensibilisierenden Wirkung ohne Tierversuche erkennen lassen, sind gerade diese zu komplex für eine Verwendung im Rahmen dieses Projektes. Ein denkbarer Ansatz ist eine sequenzielle Auswertung analog Takenouchi et al. (2015), bei der der Test mit der höchsten Accuracy bei positivem Resultat zu einer positiven Bewertung führt (im Idealfall auch mit quantitativer Aussage zur Wirkstärke). Bei negativem Resultat würde dann ein zweiter Test, ggf. ein weiterer mit einbezogen. Dies hätte den Vorteil, in der zweiten Stufe eine geringere Anzahl von Substanzen testen zu müssen, allerdings ist die Treffergenauigkeit der STS bezüglich der sensibilisierenden Wirkstärke eher mäßige Ergebnisse liefert.

Durch die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Jaworska konnten bereits konkrete Substanzen in deren praktikablen und nach Wirkstärke differenzierten Ansatz bewertet werden. Die Aussagen der ITS zur sensibilisierenden Wirkstärke sind in Kapitel 6 dokumentiert.

Bisher wurde von regulatorischen Behörden noch keine dieser Ansätze favorisiert. Es gibt derzeit keinen Ansatz, der als besonders geeignet hervorzuheben wäre. Die Validierung der Methoden auf Basis einer gemeinsamen Datengrundlage ist wünschenswert.

Im vorliegenden Projekt wird die Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke auf Basis eines „Weight of Evidence“ (WoE) Ansatzes (Zusammenschau aller gewichteten wissenschaftlichen Hinweisen“, siehe auch Abschnitt 1.1) durchgeführt. Wenn vorhanden, werden im vorliegenden Projekt z.B. folgende Daten in Bezug auf deren Einfluss auf die sensibilisierende Wirkstärke bewertet:

- physikalisch chemische Parameter
- toxikokinetische Daten (v.a. die dermale Absorption)
- Hinweise aus Humanbefunden (Epidemiologie, Testungen, Fallberichte und „industrial hygiene studies and data on exposure and health effects“)
- toxikologische Ergebnisse aus mechanistischen Studien (*in vivo* und *in vitro*), sowie
- Ergebnisse computer-basierter Systeme, inklusive prädiktive Algorithmen (z.B.(Q)SAR) und mathematische Modelle, die ausgewählte Prozesse (z.B. Hautdurchdringung) auf Basis analytischer oder numerischer Modelle beschreiben.

Eine Einordnung der Wirkstärke wird auf Basis der jeweils vorliegenden substanzspezifischen Teilinformation durchgeführt und enthält ein gewisses „Expert judgment“. Vorhersagen zur sensibilisierenden Wirkstärke auf Basis von flexibler Teilinformation wird beispielsweise auch von der ITS-3 von Jaworska et al. (2015) gemacht, andere Ranking Systeme oder ITS/STS/IATA Ansätze sind weniger flexibel.

1.4 Neue Ansätze für ein Ranking gemäß der sensibilisierenden Wirkstärke

1.4.1 Basketter et al. (2014): Ranking in 6 Kategorien auf Basis von Humandaten (NOAEL in HRIPT)

1) Highest intrinsic skin sensitising properties: nicht häufiger Hautkontakt mit niedrigen Dosen führt zu Sensibilisierungsraten $> 1\%$. Bedingungen: Konzentrationen $\leq 1\%$ im „Human Repeat Insult Patch Test“ (HRIPT) führen zu $> 90\%$ Sensibilisierung, HRIPT-Schwelle $< 25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Beispiele: Dinitrochlorbenzol, p-Phenylendiamin

2) Strong intrinsic sensitising properties: regelmäßiger Kontakt mit mittleren Konzentrationen führt zu 1-10% Sensibilisierung, bei niedrigen Konzentrationen relativ sicher. Bedingungen: NOEL (No Observed Effect Level) im HRIPT 25-500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

3) Known contact allergens: Relevante Exposition führt zu 0,01-0,1 % Sensibilisierung, niedrige Konzentrationen sensibilisieren nicht oder nur eine Minderheit. Bedingungen: NOEL im HRIPT 500-2500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

4) Rarely important clinical allergens: lange Exposition gegenüber hohen Dosen führt meist zu Sensibilisierungsraten $< 0,01\%$. Bedingungen: NOEL im HRIPT meist $> 2500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, manchmal aber auch niedriger. Beispiele: Benzocain, Resorcinol

5) Low intrinsic ability to cause skin sensitisation: nur außergewöhnlich lange Exposition gegenüber hohen Dosen bewirkt Sensibilisierung, in der Gesamtbevölkerung sehr selten. Bedingungen: NOAEL im HRIPT nicht anzugeben.

6) Free from skin sensitising activity: schließt nicht Einzelfälle aus.

Regulatorisch (CLP) würden Kategorie 5 und 6 nicht klassiert, Kategorie 3 und 4 als sensibilisierend Cat. 1 B und Kategorie 1 und 2 als sensibilisierend Cat. 1 A.

Diese Gruppenbildung erlaubt eine sehr differenzierte Kategorisierung der Wirkstärke, ist aber wegen der Verwendung von Humandaten nur bei bereits gut untersuchten Substanzen möglich. Unter den aufgeführten Beispielsubstanzen sind 4 im Zusammenhang mit Epoxidharzkomponenten relevant. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5 Beispielssubstanzen für das Ranking nach Basketter et al. (2014)

Substanz (CAS-Nummer)	Klasse	Bewertung in FP-0324 FoBiG/IVDK
N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan (109-55-7)	2	U/U
Bisphenol-A-Epichlorhydrin MW 340 (1675-54-3)	3	HS/H
Butylglycidylether (2426-08-6)	3	GMS/S
Ethylendiamin (107-15-3)	3	HS/S

An diesen Beispielen zeigt sich aber auch, dass eine Kategorisierung nicht streng nach den o.g. Kriterien erfolgt, sondern durch „Expert Judgement“ ergänzt werden muss, da für N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan, Bisphenol-A-Epichlorhydrin MW 340 und Limonen nach den Autoren kein verlässlicher humaner NOEL im HRIPT bekannt ist, welcher eigentlich erforderlich für die Einteilung zu einer bestimmten Wirkkategorie nötig ist (Basketter et al., 2014). Angesichts der unterschiedlichen Methodik können (mit Ausnahme von N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan) die Ergebnisse von Basketter et al. (2014) als Bestätigung der Kategorisierung aus FP-0324 gesehen werden.

1.5 Fazit und Bewertungsschema mit aktualisierten Cut-off Werten

Derzeit sind keine neuen Ansätze eines Ranking vorhanden, welche im Rahmen dieses Projektes für die **generelle** Neubewertung von Komponenten von Epoxidharzen Anwendung finden könnten. Insofern scheint es angebracht, die bisherige Methodik beizubehalten. Eine aktualisierte Liste mit den cut-off Werte von bekannten Tests und auch neuen *in vitro* Tests sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die probabilistische Auswertung durch Jaworska et al. (2013; 2011; Jaworska et al., 2015) scheint ein erfolgversprechender Ansatz. Die im Rahmen dieses Projektes unter Hilfe der Wissenschaftler um Joanna Jaworska bei P&G erfolgte Auswertung wird in Abschnitt 6 diskutiert.

Ergebnisse aus anderen Ranking-Systemen/ITS-Ansätzen können aber in Einzelfällen unterstützend für eine Bewertung herangezogen werden.

Insgesamt wird aus der Literaturanalyse und der Anwendung in diesem Projekt deutlich, dass keines der Systeme perfekt ist, dies bezieht sich auf jeglichen Ansatz (*in vivo*, *in vitro* und *in silico* Analysen). Ergebnisse aus verschiedenen *in vitro* und *in silico* Ansätzen sind komplementär und sollten nicht isoliert betrachtet werden. Vor allem bei Verwendung der neuen *in vitro* und *in silico* Ansätze ist demnach ein hohes Maß an Expertenwissen für eine korrekte Bewertung gefragt. Eine erste Studie zeigt auf, dass die neuen Methoden „Bekanntes“ besser vorhersagen, als noch ungeprüfte Chemikalien. Im Beispiel wurden 32 „unbekannte Chemikalien“ (d.h. nicht in den Testsets für die Entwicklung der *in vitro* Tests enthalten) überprüft. Dazu wurden die LLNA Ergebnisse mit den Ergebnissen aus fünf *in vitro* Tests (u.a. DPRA, KeratinoSens™ und h-CLAT) verglichen. Nur fünf Chemikalien wurden dabei übereinstimmend richtig eingeschätzt (vier Substanzen positiv, eine Substanz negativ) (Basketter et al., 2015). Für die Potenzbewertung werden einzelne *in vitro* Tests nicht als sehr geeignet eingestuft, eine Ausnahme bildet dabei der SENS-IS Gensignatur-Assay (siehe 0), sowie die 3D-Hautmodelle (siehe 1.2.2.1.4, Kombination epiCS® und NCTC 25544 IL-18 Test). Als vielversprechend gelten dagegen die Kombinationen der verschiedenen Tests. Eine vergleichende Bewertung aller Ansätze auf Grundlage eines einheitlichen Datensets wird jedoch gefordert. Letztlich ausschlaggebend wird die mechanistische Relevanz der

abgeprüften Test, die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Vorhersageergebnisse, sowie die Transparenz und die Anwenderfreundlichkeit (z.B. keine Verwendung kommerzieller Software) einer solchen ITS/STS/IATA sein (Ezendam et al., 2016). Eine solche abschließende Analyse wird auch klären ob letztlich Ergebnisse für alle KE vorliegen müssen, um eine valide Wirkstärkenbewertung zu ermöglichen. Erste Hinweise liegen vor, dass bereits Ansätze mit *in vitro* Tests für nur zwei KEs eine hohe Prädiktivität aufweisen (Ezendam et al., 2016).

Tabelle 6 Aktualisierte cut-off Werte der angewendeten Testsysteme

	Test	Kategorie GMS	Kategorie HS
A	Humanbefunde	Auswertung durch IVDK	
B	Klassischer LLNA	EC3 Wert > 10 %	EC3 Wert $\leq 2\%$ ¹ EC3 Wert > 2 $\leq 10\%$ ²
	GPMT ³ (+ andere Adjuvans Tests)	$\geq 30\%$ bis < 60 % Pos bei id Induktion mit > 0,1 % bis $\leq 1\%$ oder $\geq 30\%$ Pos bei id Induktion mit > 1 %	$\geq 30\%$ Pos bei id Induktion mit $\leq 0,1\%$ oder $\geq 60\%$ Pos bei id Induktion mit > 0,1 % bis $\leq 1\%$
	Buehler Test ³ (+ andere Nicht-Adjuvans Tests)	$\geq 15\%$ bis < 60 % Pos bei top. Induktion mit > 0,2 % bis $\leq 20\%$ oder $\geq 15\%$ Pos bei top. Induktion mit > 20 %	$\geq 15\%$ positive bei top. Induktion mit $\leq 0,2\%$ oder $\geq 60\%$ positive bei top. Induktion mit > 0,2 % bis $\leq 20\%$
C	Bioverfügbarkeit log $K_{O/W}$ $K_p / \log K_p$ 3D Hautmodelle → epiCS®	Nur qualitativ: gute (log $K_{O/W}$ von -2 bis 5) vs. weniger gute Bioverfügbarkeit Relativer Vergleich kongruenter Inhaltsstoffe möglich; GMS erwartet bei log K_p -Werten von < -5 Noch kein cut-off validiert (1) EE-EC ₅₀ < 7 mg/mL → stark oder extrem stark sensibilisierend, EE-EC ₅₀ ≥ 7 mg/mL → schwach oder moderat sensibilisierend; 2) Kombination aus EE-EC ₅₀ und IL-1 α_{2x}), aber relativer Vergleich chemisch verwandter Inhaltsstoffe möglich, Verwendung in Kombination mit NCTC2544 IL-18 Test	
	Haptensierung DPRA PPRA ADRA-DM	Mittlere Depletion Cystein & Lysin > 6,38 % → positiv Cystein Depletion > 13,89 % → positiv Mittlere Depletion Cystein & Lysin $\geq 10\%$ → positiv Mittlere Depletion Cystein & Lysin >7,75 % → positiv	
	Keratinozytenreaktion NCTC2544 IL-18 Test KeratinoSens™ ⁴	Cut-off noch nicht validiert (IL-18 1,2fach erhöht → positiv), Wirkstärkenbewertung nur in Kombination mit 3D Hautmodelle → epiCS® (frühere Publikationen Cut-off IL-18 1,4fach erhöht → HS) Cut-off noch nicht validiert; rel. Wirkstärke innerhalb Substanzklassen (Cut-off im Vorläufer-test ⁵ : EC1,5 $\geq 100\ \mu\text{M}$ oder $I_{\text{max}} < 3$)	
		(Cut-off im Vorläufer-test: EC1,5 < 100 μM oder $I_{\text{max}} \geq 3$)	

	Test	Kategorie GMS	Kategorie HS
	SENS-IS	Cut-off noch nicht validiert: Überexpression (> 1,3fach) von mindestens 7 Genen aus dem REDOX oder SENS-IS Panel → positiv Kein positives Ergebnis oder nur Gruppe mit 50 % Testkonzentration positiv	Positives Ergebnis in einer der drei niedrigen Testkonzentrationen (0,1, 1 oder 10 %)
	Reifung & Migration von DCs		
	U-SENS™	Cut-off noch nicht validiert (CD86 Expression: EC150 >40 µg/mL)	Cut-off noch nicht validiert (CD86 Expression: EC150 ≤ 40 µg/mL; CV70 ≤ 100 µg/mL)
	h-CLAT	Cut-off noch nicht validiert (für Einstufung H317: CD86 Expression ≥ 1,5fach und/oder CD54 Expression ≥ 2fach)	Cut-off noch nicht validiert
	VITASENS®	Kein Cut-off bestimmt (x-fache Induktion der <i>CREM/CCR2</i> Genexpression bei IC20)	Kein Cut-off bestimmt
	LCSA	Cut-off noch nicht validiert Konz. mit halbmaximaler CD86 Expression ≥ 100 µM (EC50 _{sens})	Cut-off noch nicht validiert Konz. mit halbmaximaler CD86 Expression < 100 µM (EC50 _{sens})
	ROS in THP-1	Cut-off noch nicht validiert (für Einstufung; ROS 2fach Induktion (EC2) bei ≤ 10 % Zytotoxizität)	Cut-off noch nicht validiert
	SH-Assay	Cut-off noch nicht validiert – positiv bei Ab- oder Zunahme vom Kontrollwert um mindestens 15 %	
	T-Zellaktivierung / Proliferation antigenspezifischer T-Zellen		
	CAATC-Assay und andere Tests	Kein Cut-off bestimmt	Kein Cut-off bestimmt
D	QSAR-Toolbox	Zuerst strukturelle und mechanistische Charakterisierung der Substanz und ihrer Metaboliten nötig, anhand dieser Kategoriebildung; bei genügend Substanzen in Kategorie mit experimentellen Daten qualitativer Read-out möglich	
		Standardwert aus Toolbox: -1 oder 1	Standardwert aus Toolbox: 2
	MOLCODE	Potenziell Quantifizierung möglich, jedoch kostenpflichtig	
	TOXTREE (SMARTS)	Mechanismus der Proteinreaktivität ermitteln	
	weitere <i>in silico</i> Modelle	qualitative/mechanistische Aussagen	

2 ARBEITSSCHRITT 2: AUSDEHNUNG DER SUBSTANZAUSWAHL

2.1 Erweiterte Substanzauswahl anhand der Anregung aus dem Begleitkreis

Auf Anregung des Begleitkreises aus dem Vorgängerprojekt wurde für den Antrag eine Liste weiterer Substanzen zusammengestellt, welche im Rahmen dieses Projektes (zumindest teilweise) hinsichtlich ihrer sensibilisierenden Wirkung charakterisiert und bewertet werden sollen. Diese sind in der folgenden Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7 Überblick über neue zur Bewertung vorgeschlagene Substanzen

Nr.	Substanz	CASRN	Anmerkung/Erklärung
1	Dipentene (Limonen)	138-86-3	In Epoxidharzsystemen verwendete Substanzen, die gekennzeichnet sind mit R43/H317 aber ohne schwerwiegendere Eigenschaften (kanz, repro, ätzend) und die in FP-0324 noch nicht bewertet wurden Limonen wird vermutlich nur als Duftstoff verwendet
2	[2-[(2-methyl-1-oxoallyl)oxy]ethyl] hydrogen succinate	20882-04-6	
3	3,3'-oxybis(ethyleneoxy)bis(propylamine)	4246-51-9	
4	2,2'-[methylenebis(phenyleneoxymethylene)] bisoxirane = Bisphenol F-Diglycidylether	39817-09-9	
5	N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin = bis(aminopropyl)laurylamine	2372-82-9	Von Herrn Kersting vorgeschlagen: Listung auf Basis des Vorkommens in Härter oder RV; bis auf Piperazin nicht R43 gekennzeichnet, womöglich keine Testung auf Sensibilisierung erfolgt, da als ätzend (R34/1B bzw. R35/1A) eingestuft (column 2 of REACH)
6	3-Aminopropyltriethoxysilan	919-30-2	
7	1,3-Diaza-2,4-cyclopentadien = Imidazol	288-32-4	
8	Bis[(dimethylamino)methyl]phenol	71074-89-0	s.o. aber als R43 gekennzeichnet
9	Propantriolglycidylether (1,2,3-Propanetriol, glycidyl ethers bzw. 1,2,3-Propanetriol, polymer with 2-(chloromethyl)oxirane)	90529-77-4 / 25038-04-4	
10	Piperazin	110-85-0	Epoxidharzhärter in Japan ¹³
11	Hydrazin		ätzend (ECHA, 2016b)
12	N,N-dimethyl-cyclohexanamine	98-94-2	R40, R43 (ECHA, 2016b) ¹⁴
13	Allyl 2,3-epoxypropyl ether (Allylglycidylether)	106-92-3	

¹³ Diese Substanz ist als Kanzerogen der Kategorie 1B eingestuft:
http://echa.europa.eu/documents/10162/13640/svhc_axvrep_echa_cmh_hydrazine_en.pdf

¹⁴ Diese Substanz ist auch als Kanzerogen der Kategorie 2 eingestuft

14	Propyloxirane	1003-14-1	R 40, nicht R43, vermutlich nicht selbst Epoxidharzinhaltsstoff ¹⁵
15	7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptane-3-carboxylate	2386-87-0	R43 (ECHA, 2016b) ¹⁶
16	4,4'-methylenebis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)aniline] = 4,4'-Methylenebis(N,N-diglycidylaniline) = TGMDA	28768-32-3	R43 (ECHA, 2016b; for details see CORAP justification)
17	Epoxidharzmonomere, modifiziert	25068-38-6/ 9003-36-5	z.B. O'Boyle et.al., 2014

Falls eine ungenügende Datenbasis eine Bewertung der sensibilisierenden Wirkung nicht erlaubt, sollen einige dieser Chemikalien im Rahmen dieses Projektes getestet werden. Die Auswahl erfolgte durch den Begleitkreis in Abstimmung mit dem Auftragnehmer.

Limonen scheint wegen seiner chemischen Struktur nicht als reaktive Komponente von Epoxidharzen relevant, sondern findet nur als Duftstoff Verwendung (Basketter et al., 2006). Aus diesem Grund wurde eine Bewertung zurückgestellt. Limonen selbst ist nicht oder nur schwach sensibilisierend, für die beobachtete sensibilisierende Wirkung sind seine Oxidationsprodukte, z.B. Hydroperoxide verantwortlich (Api et al., 2015; Basketter et al., 2006).

2.2 Chemische Modifikationen der Komponenten von Epoxidharzen

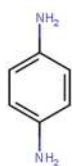
Verschiedene Autoren untersuchten den Einfluss von Strukturveränderungen sensibilisierender Substanzen auf die Wirkstärke der Sensibilisierung sowie die technische Eignung dieser modifizierten Verbindungen. Im Folgenden werden Strukturmodifikationen verschiedener Substanzen berichtet und diskutiert, welche auch im Hinblick auf Komponenten von Epoxidharzen von Relevanz sein könnten.

Goebel et al. (2014) zeigte für Strukturmodifikationen von Komponenten von Haarfärbemitteln abgeschwächte Sensibilisierung in der Peptidreaktivität, der CD86-Expression in THP-1-Zellen und im LLNA bei gleicher Funktionalität. So führte z.B. die Methylierung von p-Phenylendiamin zu einer Abschwächung der sensibilisierenden Wirkung (*in vitro* und *in vivo*; z.B. im LLNA ein EC3 Wert von 4,3 % gegenüber 0,1 % bei der Muttersubstanz). Allerdings zeigten frühere Versuche dieser Gruppe, dass eine 2-Hydroxyethylierung keine Verringerung der sensibilisierenden Wirkstärke zur Folge hat. Ob eine solche Modifikation des strukturverwandten Härterers m-Xylidendiamin (MXDA; CASRN: 1477-55-0) ebenfalls eine verminderte sensibilisierende Wirkung (bei gleicher Funktionalität) zur Folge hätte, ist nicht bekannt, kann aber im Rahmen des laufenden Projektes nicht geklärt werden.

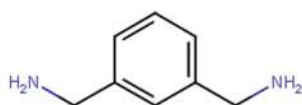
¹⁵ Diese Substanz ist auch als Kanzerogen der Kategorie 2 eingestuft (ECHA, 2016b)

¹⁶ U.S. EPA, HIGH PRODUCTION VOLUME (HPV) CHEMICALS CHALLENGE PROGRAM TEST PLAN For Cycloaliphatic Epoxy Resin ERL-4221 CAS NO. 2386-87-0

Strukturformeln:



p-Phenyldiamin



m-Xylidendiamin (MXDA)

Delaine et al. (2014) konnten zeigen, dass die sensibilisierende Wirkung von Allylalkoholen (z.B. Geraniol durch die oxidative Umwandlung zu Epoxidalkoholen und –aldehyden bestimmt wird, ähnlich dem Limonen (CASRN: 138-86-3; siehe Abschnitt 2.1), welches erst durch oxidative Prozesse in eine sensibilisierende Substanz umgewandelt wird. Von derselben Autorengruppe wurden α,β -ungesättigte Aldehyd- und 2,3-Epoxyaldehydgruppen als Struktur determinanten der Sensibilisierung identifiziert (Delaine et al., 2013), was für die oxidative Aktivierung dieser Verbindungen spricht. Die Autoren weisen zudem darauf hin, dass die strukturell sehr ähnlichen Substanzen sich teilweise stark in ihrer Wirkstärke unterscheiden (schwache bis starke Sensibilisierer) und dass, bereits kleine Strukturänderungen genügen um diese Unterschiede zu bewirken. Allerdings wurde die Bewertung von Limonen zurückgestellt (s.o.).

Speziell zu Komponenten von Epoxidharzen unternahm O'Boyle et al. (2014) Versuche zur Synthese von Epoxidharzmonomeren mit geringerer Sensibilisierungspotenz. Als Ausgangsprodukte dienten Bisphenol A- und Bisphenol F-Diglycidylether (siehe Abbildung 8).

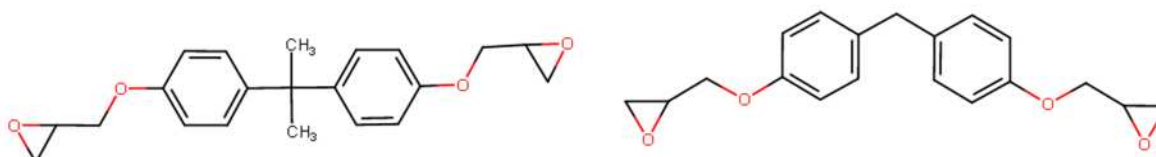


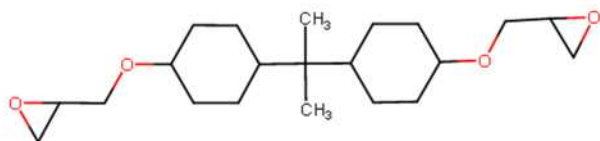
Abbildung 8: Strukturformeln für Bisphenol A-Diglycidylether (links) und Bisphenol F-Diglycidylether (rechts)

Diese wurden folgendermaßen modifiziert:

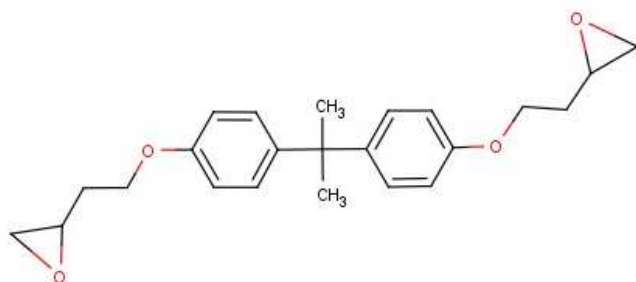
- durch Einführung nichtaromatischer Ringe
- durch Verlängerung der 2,3-Epoxypropoxyseitenketten zu 3,4-Epoxybutoxygruppen
- durch Verkürzung der 2,3-Epoxypropoxyseitenketten zu 2,3-Epoxypropylgruppen

Die Strukturformeln (nur für Bisphenol A-Diglycidylether gezeigt) sind in der folgenden Abbildung 9 wiedergegeben.

a)



b)



c)

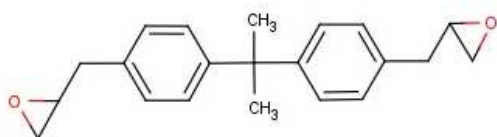


Abbildung 9: Strukturformeln der Modifikationen von Bisphenol A-Diglycidylether

Diese Verbindungen wurden hinsichtlich ihrer sensibilisierenden Eigenschaften im LLNA, teilweise auch im DPRA, und ihrer technischen Eignung (initiale Zersetzungstemperatur, Aktivierungsenergie für Zersetzung, maximale Gewichtsverlustrate und Temperatur bei maximaler Gewichtsverlustrate nach Polymerisation mit Triethylentetramin) getestet.

Hierbei zeigte sich, dass die modifizierten Diglycidylether im LLNA eine maximal um den Faktor 2,3 höhere EC3 als die Muttersubstanz aufweisen, entsprechend einer geringeren Wirkstärke der Sensibilisierung. Eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse der Tests auf Sensibilisierung erfolgt in Abschnitt 3.3.8.

Die Untersuchungen zu technischer Eignung der Polymerisate ergaben für die Varianten mit verlängerten Seitenketten (b) eine deutlich niedrigere Zersetzungstemperatur (nach den Autoren möglicherweise wegen eines verringerten Crosslinkings), für die anderen beiden Varianten leicht höhere Werte. Auf Basis dieser und der anderen physiko-chemischen Eigenschaften wurden von O'Boyle et al. (2014) vor allem die Varianten mit verkürzter Seitenkette (Variante c) technisch als adäquat zu den Muttersubstanzen angesehen. Diese Modifikation von Bisphenol F-Diglycidylether zeigte auch im LLNA den höchsten EC3-Wert. Ob dies auch für Bisphenol A-Diglycidylether und seine Derivate zutrifft, könnte in einem LLNA oder einem *in vitro* Test (dann aber auch mit einem direkten Vergleich der Bisphenol F-Diglycidylether-Varianten) verifiziert werden. Im Rahmen dieses Projekts ist dies nicht möglich.

In einer früheren Veröffentlichung dieser Arbeitsgruppe wurden andere Varianten von Bisphenol A-Diglycidylether und Phenylglycidylether getestet, bei denen die Oxirangruppen durch Methoxygruppen (O-CH₃) ersetzt wurden. Diese Modifikationen zeigten eine geringere Wirkstärke im LLNA und KeratinoSensTM und liefern einen weiteren Beleg für die Relevanz der Epoxidgruppen bei der Sensibilisierung (O'Boyle et al., 2012). Über die technische Verwendbarkeit wurden keine Untersuchungen angestellt, jedoch scheint der Ersatz der Epoxidgruppen eine drastische Minderung der Reaktivität zu implizieren. Deshalb wird eine weitergehende Bewertung zurückgestellt.

Eine weitere Studie befasste sich mit anderen Varianten des Phenylglycidylethers, welche in der folgenden Abbildung 10: Phenylglycidylether (a; CASRN: 122-60-1) und dessen Strukturmodifikationen (b-f) wiedergegeben sind. Diese wurden im LLNA und im KeratinoSensTM getestet (Delaine et al., 2011).

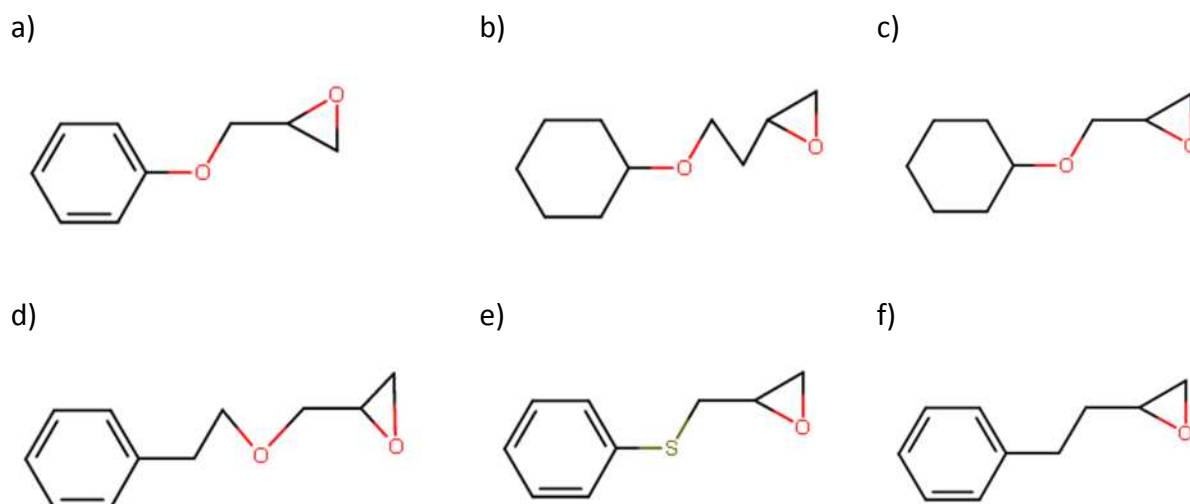


Abbildung 10: Phenylglycidylether (a; CASRN: 122-60-1) und dessen Strukturmodifikationen (b-f)

Phenylglycidylether erwies sich auch in dieser Untersuchung im LLNA als stark sensibilisierend, ebenso Variante e), bei der das Sauerstoffatom der Seitenkette durch Schwefel ersetzt wurde. Alle anderen Varianten waren im LLNA mittelstark sensibilisierend. Schwache Sensibilisierer waren lediglich Modifikationen, bei denen der aromatische Ring durch eine n-Butylgruppe oder eine 2-Butengruppe ersetzt wurde (Struktur nicht gezeigt). Ob diese Varianten technisch geeignet für den Einsatz in Epoxidharzen sind, wurde bei Delaine et al. (2011) nicht untersucht. Deshalb wird eine weitergehende Bewertung zurückgestellt.

Diese Varianten wurden bereits von Niklasson et al. (2009; 2011) im DPRA und LLNA getestet, wobei vergleichbare Ergebnisse wie bei Delaine et al. (2011) erhalten wurden. In diesen Tests war auch ein Analog von Derivat e) mit einem Stickstoff- statt einem Schwefelatom stark wirksam.

Auch auf wiederholte Anfrage bezüglich weitergehender Informationen beim Lehrstuhl der Universität Göteborg, welcher diese Forschungen vornahm, konnte keine Rückmeldung

erhalten werden. Dagegen konnte von einer der Autorinnen (Niam O'Boyle) noch zusätzliches Material erhalten werden, in dem bislang unveröffentlichte humane Patch-Tests mit den derivatisierten Bisphenol F-Diglycidylethern berichtet wurden. Diese sind im Detail in Abschnitt 4 referiert.

2.3 Finale Neustoffliste für FP-0384

Im Rahmen einer Sitzung des Begleitkreises (9.9.2015) wurde anhand weiterer Listen von in Epoxidharzsystemen relevanten Substanzen diskutiert, welche von diesen im Rahmen des FP-0384 bewertet werden sollten. Diese entstammten

der bereits in FP-0324 auf Anregung der Industrie nachgereichten Liste (

- Tabelle 8)
- der im Forschungsantrag für FP-384 beinhaltete Liste (siehe Abschnitt 2.1, Tabelle 7)
- und einer ergänzende Liste auf Anregung der Baustoffchemie (Tabelle 9)

Tabelle 8 **Zusätzliche Stoffliste aus Expertenbefragung in FP-0324**

CASRN	Substanz	FoBiG	IVDK
9046-10-0	Poly[oxy(methyl-1,2-ethanediyl)], ?-(2-aminomethylethyl)- ?-(2-aminomethylethoxy)	-	U
	PolyPropylenEthyleneDiamin	-	U
37189-83-6	12-Octadecadienoic acid (9Z,12Z)-, dimer, polymer with N-(2-aminoethyl)-1,2-ethanediamine	-	U
6864-37-5	2,2'-dimethyl-4,4'methylenebis(cyclohexylamine)	-	U
	Polyaminoamido-imidazolines	-	U
	Asparaginsäureester	-	-
55492-52-9	Bisphenol F-Epoxidharz	-	H

Tabelle 9 **Zusätzliche Stoffliste auf Anregung der Deutschen Bauchemie e.V.**

CASRN	Substanz	R-Sätze	H-Sätze
1173092-74-4	Carbomonocyclisch alkyliertes Gemisch aus Poly-Aza-Alkanen, hydriert	34-43	314-317
135108-88-2	Formaldehyd, Polymer mit Benzenamin, hydriert	22-34-43-48/22-52/53	302-314-317-373-412
68391-18-4	4,4'-Isopropylidendiphenol, oligomere Reaktionsprodukte mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan, Reaktionsprodukte mit 2-Piperazin-1-ylethylamin	21/22-34-43-52/53	302-312-314-317-412
158885-14-4	4,4'-Isopropylidendiphenol, oligomere Reaktionsprodukte mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 1,3-Cyclohexandimethanamin		302-312-314-317-412
113930-69-1	4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und m-phenylenbis(methylamin)	34-43-51/53	314-317-411
38294-64-3	4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Amino-methyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin	34-43-52/53	314-317-412

Auf der Sitzung des Begleitkreises wurden die in diesen drei Listen enthaltenen Substanzen hinsichtlich ihrer Relevanz in Epoxidharzsystemen diskutiert und als Ergebnis folgende Liste (Tabelle 10) für eine weitergehende Bearbeitung im Rahmen dieses Projektes zusammengestellt:

Tabelle 10 **Ergebnis der in FP-0384 zusätzliche zu bearbeitenden Inhaltsstoffe**

Substanz	CASRN	Anmerkung/Erklärung
N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin	2372-82-9	Von BG Bau vorgeschlagen: Listung auf Basis des Vorkommens in Härter oder RV; nicht R43 gekennzeichnet, womöglich keine Testung auf Sensibilisierung erfolgt da als ätzend (R34/1B bzw. R35/1A) eingestuft (column 2 of REACH)
3-Aminopropyltriethoxysilan Haftvermittler, <1%, prio niedrig	919-30-2	
Bis[(dimethylamino)methyl]phenol	71074-89-0	
Propantriolglycidylether (1,2,3-Propanetriol, glycidyl ethers bzw. 1,2,3-Propanetriol, polymer with 2-(chloromethyl)oxirane)	90529-77-4/ 25038-04-4	
N,N-Dimethyl-cyclohexanamin	98-94-2	

7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptane-3-carboxylat	2386-87-0	R43 (ECHA, 2016b) ¹⁷
4,4'-Methylenbis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)anilin]	28768-32-3	R43 (ECHA, 2016b; for details see CORAP justification)
Epoxidharzmonomere (siehe Abschnitt 2.2)	-	Modifizierte Epoxidharze, O'Boyle et.al., 2014
Formaldehyd, Polymer mit Benzenamin, hydriert (technisches Produkt)	135108-88-2	Vorschlag Dt. Bauchemie, R43
4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin	38294-64-3	Vorschlag Dt. Bauchemie, R43

Nach der Sitzung des Begleitkreises wurde eine zusätzliche Liste von Herrn Kersting aus dem Bereich der Klebstoffindustrie nachgereicht (Tabelle 11):

Tabelle 11 **Zusätzliche Stoffliste auf Anregung der Klebstoffindustrie (nachgereicht)**

CASRN	Substanz
25513-64-8	2,2,4-Trimethylhexan-1,6-diamin (Einzelisomer von Trimethylhexamethyldiamin (TMD), CASRN 25620-58-0)
2579-20-6	1,3-Cyclohexylen-bis-methylamin
90640-46-3	Polyethylenpoly-, triethylentetramin

¹⁷ U.S. EPA, HIGH PRODUCTION VOLUME (HPV) CHEMICALS CHALLENGE PROGRAM TEST PLAN For Cycloaliphatic Epoxy Resin ERL-4221 CAS NO. 2386-87-0

Aus diesen Listen wurde abschließend die folgende Stoffliste (Tabelle 12) für die Bearbeitung in FP-0384 erstellt:

Tabelle 12 **Finale Inhaltsstoffliste für die Bearbeitung im Projekt FP-0384**

CASRN	Substanz	FP-0324 -Wirkstärke	
		FoBiG	IVDK
	Epoxidharze		
25068-38-6	Bisphenol A-Harze	HS	H
25085-99-8	Reaktionsprodukt Bisphenol A Epichlorhydrin	HS	H
1675-54-3	Bisphenol-A-Epichlorhydrin MW 340	HS	H
9003-36-5	Bisphenol F-Harze	HS	H
28064-14-4	Bisphenol-F-Epichlorhydrin	HS	H
13410-58-7	Epoxidharz-Monomer a) (aus O'Boyle)	-	-
-	Epoxidharz-Monomer b) (aus O'Boyle)	-	-
-	Epoxidharz-Monomer c) (aus O'Boyle)	-	-
	Härter, aromatische Amine		
101-77-9	4,4'-Diaminodiphenylmethan	GMS	U
	Härter, aliphatische Amine		
107-15-3	Ethylendiamin	HS	S
111-40-0	Diethylentriamin	HS	S
56-18-8	Dipropylentriamin	U → GMS	U
25620-58-0 / 25513-64-8	Trimethylhexamethylendiamin (TMD) / 2,2,4- Trimethylhexan-1,6-diamin (Einzelisomer)	HS	U
112-24-3	Triethylentetramin	HS	S
109-55-7	N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan	U → GMS	U
112-57-2	Tetraethylenpentamin	GMS	U
4067-16-7	Pentaethylenhexamin	GMS	U
68131-73-7	Polyethylenpolyamin	GMS	U
26336-38-9	Polyethylenamin	GMS	U
2372-82-9	N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin (Bis(aminopropyl)laurylamin)	-	-
	Härter, cycloaliphatische Amine		
1761-71-3	4,4'-Diaminocyclohexylmethan	U → GMS	U
136210-32-7	Bis(4-(1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethylamino)-3- methylcyclohexyl)methan	U	U

140-31-8	N-Aminoethylpiperazin, 2-Piperazin-1-ylamin	U	U
2855-13-2	Isophorondiamin (IPD), 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin	HS	H
3312-60-5	3-Cyclohexylaminopropylamin	U	U
694-83-7	1,2-Diaminocyclohexan (DCH)	U	U
2579-20-6	1,3-Cyclohexylen-bis(methylamin)	-	-
	Härter, sonstige		
1477-55-0	m-Xylidendiamin (MXDA)	HS	H
73050-11-0	m-Xylylendiamin/Acrylonitril Adduct	U	U
1760-24-3	N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan	U	U
2997-01-5	Polyoxyalkylenamin, 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	U	U
919-30-2	3-Aminopropyltriethoxysilan	-	-
38294-64-3	Oligomerisierter Härter: 4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin	-	-
135108-88-2	Formaldehyd, Polymer mit Benzenamin, hydriert	-	-
90640-46-3	Polyethylenpoly-, triethylentetramin	-	-
	Säureanhydride		
85-44-9	Phthalsäureanhydrid	HS → SHS	U
85-43-8	Tetrahydrophthalsäureanhydrid	HS	U
85-42-7	Hexahydrophthalsäureanhydrid	HS	U
11070-44-3	Methyltetrahydrophthalsäureanhydrid	U	U
25550-51-0	Methylhexahydrophthalsäureanhydrid	U	U
	Sekundäre und tertiäre Amine		
93941-62-9	3-((6-Aminotrimethylhexyl) amino)propionitril (= N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin)	U	U
98-94-2	N,N-Dimethyl-cyclohexanamin	-	-
	Phenole		
98-54-4	tert-Butylphenol	GMS	S
80-05-7	Bisphenol A	GMS	S
90-72-2	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	U	U
71074-89-0	Bis[(dimethylamino)methyl]phenol	-	-
	Reaktivverdünner		
2426-08-6	Butylglycidylether	GMS	S
2425-79-8	1,4-Butandiol-diglycidylether	HS	H

17557-23-2	Neopentylglykol-diglycidylether	U	U
2461-15-6	2-Ethylhexylglycidylether	U	U
16096-31-4	1,6-Hexandiol-diglycidylether	HS	H
26761-45-5	Versaticsäureglycidylester (z.B. Cadura E 10)	GMS	U
30499-70-8	Trimethylolpropan-triglycidylether	U → HS	U
68609-97-2	C12/C14-Monoglycidylether	U → GMS	U
26142-30-3	Polypropylenglykoldiglycidylether/ Polyoxypropylen-diglycidylether	U → GMS (Ü)	U
9072-62-2	Polypropylenglycol-chloromethyloxiran polymer	U → GMS (Ü)	U
41638-13-5	Dipropylenglycol-diglycidyl ether	U	U
14228-73-0	Cyclohexandimethanol-diglycidylether	U / U	U / U
17351-75-6	Cyclohexandimethanol-divinylether		
3101-60-8	p-tert.-Butylphenol-monoglycidylether	U	U
122-60-1	Phenylglycidylether	HS → SHS	H
2210-79-9	o-Kresylglycidylether	HS (Ü)	H
26447-14-3	Kresyl-glycidylether, Isomerengemisch	HS	H
90529-77-4 / 25038-04-4	Propantriol-glycidylether (1,2,3-Propantriol-glycidylether / 1,2,3-Propanetriol, polymer mit 2-(chlormethyl)oxiran)	-	-
2386-87-0	7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat	-	-
28768-32-3	4,4'-Methylenbis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)anilin] (TGMDA)	-	-

3 ARBEITSSCHRITT 3: ERWEITERTE DATENDOKUMENTATION ZUR SENSIBILISIERENDEN WIRKUNG BEI ERWEITERTER SUBSTANZAUSWAHL

3.1 Allgemein

Die Suche nach vorhandenen Daten für die Inhaltsstoffe war – wie bereits in FP-0324 - auf zwei Säulen gestützt. Die Suche nach veröffentlichter Literatur wurde einerseits

- substanzspezifisch und andererseits
- methodenorientiert

durchgeführt.

Die Suche nach substanzspezifischer Literatur für Inhaltsstoffe, die bereits in FP-0324 bewertet wurden, sowie für methodenorientierte Neuveröffentlichungen wurde auf die Jahre ab 2012 beschränkt. Für neu zu bewertende Inhaltsstoffe erfolgte die Literaturrecherche ohne Begrenzung des Veröffentlichungsdatums.

Sowohl die substanzspezifischen, als auch die methodenorientierte Suche wurden wie bereit im Vorgängerprojekt durchgeführt.

Als Ausgangspunkt wurde das Literatursuchportal PubMed (NLM, 2016c) (Suchworte bei substanzspezifischer Suche: „allergy OR allergic OR hypersensitiv* OR sensitiv* OR sensitiz*“ – verknüpft mit CAS-Nummer oder dem Namen der Substanz). Weiterhin wurde die „Dissemination Database“ der Europäischen Chemikalienbehörde (ECHA) auf das Vorhandensein eines Registrierungsdossiers für den fraglichen Inhaltsstoff überprüft (ECHA, 2016b). Abschließend wurde noch eine Suche über Google bzw. Google Scholar durchgeführt.

In den Kapiteln 3.2 und 3.3 sind die gefundenen Daten jeweils pro Substanz aufgeführt und mit den entsprechenden Quellen versehen (Stand systematische Literatursuche Oktober 2015; teilweise ausgeweitet bis Mai 2016).

Anmerkungen:

Humanbefunde („*In vivo* (Schritt A)“) werden in Kapitel 3 nicht berichtet, da die Bearbeitung durch den Informationsverbund Dermatologischer Kliniken (IVDK; Prof. Geier) erfolgt (siehe eigenständiger Teilbericht).

Nachfolgend sind alle bisher ermittelten Ergebnisse aus *in vivo* (ohne Humanbefunde), *in vitro* oder *in silico* Experimenten jeweils substanzspezifisch in Kurzform aufgelistet. Soweit möglich, wurden, wie in Teilbericht 5.1 beschrieben, *in silico* Anwendungen zur Bereitstellung von zusätzlichen Daten durchgeführt. Für alle Inhaltsstoffe mit verfügbarer Struktur (SMILES Code) wurden die Module TOXTREE, sowie die QSAR Toolbox Modelle zur Proteinbindung (OECD und OASIS) und ggf. der Metabolismus-Simulator angewandt. Letzteres nur, wenn keine direkte Proteinreaktivität des Inhaltsstoffes gefunden wurde. Nicht jedes negative Ergebnis (d.h. keine Aussage) wird substanzspezifisch explizit erwähnt. Steht für einen Inhaltsstoff ein SMILES zur Verfügung und in der Rubrik „*in silico* (Schritt D)“ wurde „derzeit keine Information“ vermerkt, so bedeutet dies, dass durch keines der oben genannten Modelle eine Information über den möglichen Reaktivitätsmechanismus bzw. mögliche Metaboliten des Inhaltsstoffes gefunden werden konnte.

3.2 Aktualisierung der Datenlage zu bereits in FP-0324 bewerteten Substanzen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse einer Nachrecherche zu den in FP-0324 bewerteten Substanzen berichtet. Insbesondere wurden mittlerweile erschienene Registrierungs dossiers auf nicht veröffentlichte Industriestudien geprüft.

Vorbemerkung: In mehreren Studien werden zu Vergleichszwecken Ergebnisse zu *in vivo* und *in vitro* Tests aus früheren Veröffentlichungen verwendet. Nicht in allen Fällen war die konkrete Zuordnung eines Resultates zu einer bestimmten Veröffentlichung möglich (bei Nennung einer Reihe von Veröffentlichungen zum Datensatz ohne konkrete Zuordnung zum Einzeldatum). In diesem Fall wurde als Quelle die letzte nachvollziehbare Literatur angegeben.

3.2.1 Epoxidharze

3.2.1.1 Bisphenol A-Harze, CASRN 25068-38-6

In diesem Abschnitt werden auch die Ergebnisse des Reaktionsprodukts Bisphenol A Epichlorhydrin (CASRN 25085-99-8) und Bisphenol A-Diglycidylether, CASRN 1675-54-3 berichtet.

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H315-H317-H319-H411 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Diese Epoxidharze (mit Molekulargewicht < 900 Da) sind die häufigsten und wichtigsten Auslöser der Kontaktallergie beim Menschen (v.a. Baugewerbe – weit verbreitet und häufigstes Allergen). Fast alle vorliegenden Meerschweinchentests zu Bisphenol A-Diglycidylether und Harzen waren positiv, sofern die Molekülgröße 1000-1200 nicht überschritt. Ein vorliegender LLNA ergab für Bisphenol A-Harz im Vehikel Aceton ein positives Ergebnisse, bei Verwendung von Aceton/Olivenöl (AAO) einen positiven und einen negativen Befund. Auch Bisphenol A-Diglycidylether in AAO war im LLNA positiv, in Dimethylformamid negativ.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit ist gemäß dem log $K_{O/W}$ als gut zu bewerten. Bisphenol A-Diglycidylether (CASRN 1675-54-2) zeigte im KeratinoSensTM positive Reaktionen (EC_{1,5} = 5 µM, I_{max} = 13 µM).
- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- **Gesamtbewertung: HS**

Bisphenol-A-Epichlorhydrin MW 340 (CAS-Nummer 1675-54-3) ist in einem neuen Ranking-System (Basketter et al., 2014) in Kategorie 3 (Known contact allergens) klassiert (siehe Abschnitt 1.4.1).

Neu veröffentlichte experimentelle Daten sind in der folgenden Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13 **Neue Ergebnisse zu Bisphenol A-Diglycidylether (1675-54-3)**

Test	Ergebnis	Bemerkungen	Quelle
<i>in vivo</i>			
LLNA	positiv EC3: 1,24 %	Vehikel AOO*, LLNA-Daten in FP0324 nicht berücksichtigt, Wertung der Autoren nicht einheitlich: „moderate“ (Delaine) bzw. „strong“ (O'Boyle)	(Delaine et al., 2011) Bewertung der Wirkstärke auch in (O'Boyle et al., 2014)
	positiv SI: 8,38 (arithmetisches Mittel, EC3 nicht ausweisbar)	Vehikel AOO, nicht gepoolte Individualdaten, nur eine Konzentration getestet	(O'Boyle et al., 2014)
modifizierter rLLNA (vgl. 1.2.1.3)	positiv EC3: 0,5 %	Wert ähnlich der EC3 (1,5 %) eines klassischen LLNA aus der Literatur	(Roberts, 2015)
<i>in vitro</i>			
DPRA	positiv Mittlere Depletion: 39 % (Cys: 74,8, Lys:3,2%)	mittelstark nach OECD 442C, Peptidüberschuss 10- (Cys) bzw. 50-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h	(Hirota et al., 2015; Nukada et al., 2013; Takenouchi et al., 2015)
	positiv Mittlere Depletion: 23,4 % (Cys: 42,5, Lys: 1,1 %)	mittelstark nach OECD 442C und Kriterien der Autoren, Peptid-überschuss 10- (Cys) bzw. 50-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h	(Natsch et al., 2013)
Keratino Sens™	positiv EC1,5: 5,2 µM		(Natsch et al., 2013)
h-CLAT	positiv EC1,5 (CD86): 18,27 EC2,0 (CD54): 22,2 CV75 (Zytotox.): 36 µg/mL		(Ashikaga et al., 2010; Hirota et al., 2015; 2013; Nukada et al., 2012; Takenouchi et al., 2015; Tsujita-Inoue et al., 2014)
MUSST	positiv EC1,5: 26,4 µM		(Natsch et al., 2013)

in silico

Test	Ergebnis	Bemerkungen	Quelle
iSENS vers. 2	mittelstark (1675-54-3) vorhergesagte EC3 im LLNA: 7,3 %	ANN Modell welches 3D- Molekülstruktur miteinbezieht	(Tsuji-Inoue et al., 2015)
DEREK	positiv	Substanz ist nicht Teil des Trainingssets	(Nukada et al., 2013; Takenouchi et al., 2015)

*: AOO: Aceton/Olivenöl 4:1

3.2.1.2 Reaktionsprodukt Bisphenol A Epichlorhydrin, CASRN 25085-99-8

siehe unter der CASRN 25068-38-6

3.2.1.3 Bisphenol-A-Epichlorhydrin MW 340, Bisphenol A-Diglycidylether, CASRN 1675-54-3

siehe unter der CASRN 25068-38-6

Einstufung: H319-H315-H317 (ECHA, 2016a)

3.2.1.4 Bisphenol F-Harze, CASRN 9003-36-5

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H315-H317-H411 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Diese Epoxidharze wirken beim Menschen stark sensibilisierend. 5 von 6 Meerschweinchentests waren positiv. Der vorliegende LLNA ergab für Bisphenol F-Harz im Vehikel Aceton eine EC3 von 0,7 % (EC1,5 = 0,6 %). In einer zweiten, unabhängigen Testung in Aceton im Vehikel Aceton ein positives Ergebnisse, bei Verwendung von Aceton/Olivenöl (AOO) einen negativen Befund.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit ist gemäß dem log K_{O/W} als gut zu bewerten. Bisphenol F-Diglycidylether (CASRN 28064-14-4) zeigte im KeratinoSensTM positive Reaktionen (EC1,5 = 7 µM, I_{max} = 5 µM).
- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- **Gesamtbewertung: HS**

Neue Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14 Neue Ergebnisse zu Bisphenol F-Diglycidylether

Test	Ergebnis	Bemerkungen	Quelle
<i>in vivo</i>			
LLNA	positiv EC3: 1,13 %	Vehikel AOO* LLNA-Daten in FP-0324 nicht berücksichtigt, Wertung der Autoren nicht einheitlich: „moderate“ (Delaine) bzw. „strong“ (O’Boyle)	(Delaine et al., 2011) Bewertung der Wirkstärke auch in (O’Boyle et al., 2014)
<i>in vitro</i>			
DPRA	positiv Depletion: 92,2 %	Restmenge Peptid (80 min): 7,8 % Substanzüberschuss 10-fach gegenüber Peptid	(O’Boyle et al., 2012)

*: AOO: Aceton/Olivenöl 4:1

3.2.1.5 Bisphenol-F-Epichlorhydrin, CASRN 28064-14-4

siehe unter der CASRN 9003-36-5

3.2.2 Härter, aromatische Amine

3.2.2.1 4,4'-Diaminodiphenylmethan, CASRN 101-77-9

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H373-H317-H341-H350-H370-H411 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Die Substanz wird als relativ häufiges Allergen bei Epoxidharz-Exponierten und -Allergikern gefunden. Ergebnisse aus den Versuchen an Meerschweinchen deuten auf eine sehr geringe sensibilisierende Wirkstärke hin.
- *In vitro*: Es liegen nur Daten zu dermalen Resorption vor (gering bis mittlere Aufnahme in die Haut).
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, z.B. Michael Addition)
- **Gesamtbewertung: GMS**

Aktuellere Daten konnten nicht gefunden werden, vermutlich weil die Substanz als Kanzerogen (H350) nicht weiter verwendet wird (siehe auch neuere Berechnungen der Höhe des berufsbedingten Krebsrisikos, (HCN, 2015)).

3.2.3 Härter, aliphatische Amine

3.2.3.1 Ethylendiamin, CASRN 107-15-3

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H226-H311-H302-H332-H314-H334-H317 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde erlauben keine Zuordnung zu einer Wirkstärkenkategorie. Die Mehrzahl der vorliegenden Versuche an Meerschweinchen kam zu einem positiven Ergebnis, für Ethylendiaminhydrochlorid jedoch zu negativen Resultaten. Im LLNA war die freie Base stark positiv.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit der Substanz wird als gerade noch gut eingeschätzt. In DPRA-Tests zeigte sich eine nur geringe Reaktivität (Peptiddepletion: > 6,4 bis maximal 15 %). Positive Ergebnisse wurden im ARE Luciferasetests (u.a. KeratinoSensTM; EC1,5 = 99,9 µM, I_{max} = 13,2 µM), im MUSST, im Reifungstest von T-Lymphozyten und im h-CLAT erzielt.
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- **Gesamtbewertung: HS**

Die Substanz ist in einem neuen Ranking-System (Basketter et al., 2014) in Kategorie 3 (Known contact allergens) klassiert (siehe Abschnitt 1.4.1).

Mittlerweile veröffentlichte Daten sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15 Neue Ergebnisse zu Ethylendiamin

Test	Ergebnis	Bemerkungen	Quelle
<i>in vivo</i>			
-			
<i>in vitro</i>			
DPRA	negativ Mittlere Depletion: 0,35 % (Cys: 0,7, Lys: -0,3 %)	Peptidüberschuss 10- (Cys) bzw. 50-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h	(Hirota et al., 2015; Nukada et al., 2013; Takenouchi et al., 2015)
	negativ Mittlere Depletion: 1,71 % (Cys: 3,4, Lys: 0 %)	Peptidüberschuss 10- (Cys) bzw. 50-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h	(Natsch et al., 2013)
	positiv Mittlere Depletion: 9,7 % (Cys: 0,7 Lys:18,6 %)	Peptidüberschuss 15- (Cys) bzw. 3-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h schwach nach OECD 442C	(Bauch et al., 2012)
PPRA	negativ (EC15 > 30 mM)	keine der Testkonz. führt zu einer Depletion von mindestens 15 %	(Lalko et al., 2013)

SH-Assay	positiv Maximale Depletion: 19,5 %	Es werden nur Werte bei Zytotoxizität < 50 % bestimmt	(Hirota et al., 2015; 2013; Suzuki et al., 2009; Tsujita-Inoue et al., 2014)
ARE-Assay	positiv E1,5: 132,8 µg/mL I _{max} : 2,03	Induktion > 1,5 des Kontrollwertes gilt als positives Ergebnis. Es werden nur Werte bei Zytotoxizität < 50 % bestimmt	(Hirota et al., 2015; Tsujita-Inoue et al., 2014)
KeratinoSens™	positiv EC1,5: 99,88 µM		(Natsch et al., 2013)
	positiv EC1,5: 451,7 µM	Siehe auch Kapitel 5	Testung innerhalb dieses Projekts (FP-0384)
LuSens	negativ EC1,5: -		(Bauch et al., 2012)
	negativ EC1,5: > 750 µM		(Ramirez et al., 2014)
SENS-IS	positiv (10 % → moderat sensibilisierend, gemäß den Wirkstärkeregeln im LLNA)	Laut Autoren vergleichbar mit der Einordnung von Humandaten von (Basketter et al., 2014)	(Cottrez et al., 2016)
U-SENS	Positiv (EC150 = 16 µg/mL; CV70 = 58 µg/mL)	Laut Vorhersagemodell Cat 1A nach CLP (EC, 2008)	(Piroird et al., 2015)
h-CLAT	positiv EC1,5 (CD86): 265,7 EC2,0 (CD54): - CV75 (Zytotox.): 271,7 µg/mL	Es werden nur Werte bei Zytotoxizität < 50 % bestimmt	(Ashikaga et al., 2010; Hirota et al., 2015; 2013; Nukada et al., 2012; Takenouchi et al., 2015; Tsujita-Inoue et al., 2014)
	positiv EC1,5 (CD86): 109 µg/mL EC2,0 (CD54): -		(Bauch et al., 2012)
MUSST	positiv EC1,5: 782,0 µM		(Natsch et al., 2013)
	negativ EC1,2: 25 µg/mL (412 µM)		(Bauch et al., 2012)

Human Skin Explant Test	positiv T-Zellstimulation: 5,25- fach IFN- γ -Stimulation: 11,3- fach	Maximale Testkonzentration assoziiert mit < 15 % Zytotoxizität	(Ahmed et al., 2016)
<i>in silico</i>			
iSENS vers. 2	schwach bis mittelstark vorhergesagte EC3 im LLNA: 7,1-11 %	unterschiedliche Werte in Abhängigkeit von Modellversion	(Tsujita-Inoue et al., 2014)
iSENS vers. 2	mittelstark vorhergesagte EC3 im LLNA: 2,6 %	ANN Modell welches 3D- Molekülstruktur miteinbezieht	(Tsujita-Inoue et al., 2015)
DEREK	positiv	Substanz ist Teil des Trainingssets	(Nukada et al., 2013; Takenouchi et al., 2015)

3.2.3.2 Diethylentriamin, CASRN 111-40-0

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H302-H312-H314-H317-H330-H335 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Im Human Maximierungstest wurde die Substanz als starkes Allergen bezeichnet. Wegen der geringen bis mäßigen Verwendung ist die absolute Zahl der Patienten mit einer Kontaktallergie aber relativ gering. 2 Versuchen an Meerschweinchen kamen zu einem positiven Ergebnis. In LLNA-Tests war die Substanz positiv.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit der Substanz wird als gerade noch gut eingeschätzt. Im DPRA Test zeigte sich eine nur geringe Reaktivität (mittlere Peptiddepletion: 7,8 %). Ein positives Ergebnis wurde im KeratinoSensTM (EC1,5 = 1259,4 μ M, I_{max} = 1,7 μ M) gemessen.
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- **Gesamtbewertung: HS**

Mittlerweile veröffentlichte Daten sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16 Neue Ergebnisse zu Diethylentriamin

Test	Ergebnis	Bemerkungen	Quelle
<i>in vivo</i>			
-			
<i>in vitro</i>			
DPRA	positiv Mittlere Depletion: 22,4 % (Cys:44,80, Lys: -1,9 %)	Peptidüberschuss 10- (Cys) bzw. 50-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h grenzwertig schwach/ mittelstark nach OECD 442C	(Hirota et al., 2015; Nukada et al., 2013; Takenouchi et al., 2015)
	negativ Mittlere Depletion: 4 % (Cys: 5,7, Lys: -2,3 %)	Sekundär zitierte unveröffentlichte Daten	(Urbisch et al., 2015, supplementary table)
Keratino Sens™	negativ EC1,5: -	Siehe auch Kapitel 5	Testung innerhalb dieses Projekts (FP-0384)
h-CLAT	negativ EC1,5 (CD86): - EC2,0 (CD54): - CV75 (Zytotoxizität): 1221,6 µg/mL	Es werden nur Werte bei Zytotoxizität < 50 % bestimmt	(Ashikaga et al., 2010; Hirota et al., 2015; 2013; Nukada et al., 2012; Takenouchi et al., 2015; Tsujita-Inoue et al., 2014)
<i>in silico</i>			
iSENS vers. 2	mittelstark vorhergesagte EC3 im LLNA: 2,7 %	ANN Modell welches 3D- Molekülstruktur miteinbezieht	(Tsujita-Inoue et al., 2015)
DEREK	positiv	Substanz ist Teil des Trainingssets	(Nukada et al., 2013; Takenouchi et al., 2015)

3.2.3.3 Dipropylentriamin, CASRN 56-18-8

Einstufung: H302-H311-H314-H317-H330 (ECHA, 2016a)

- *Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:*
- *In vivo:* Humanbefunde erlauben keine abschließende Bewertung. Ein GPMT und ein LLNA kamen zu positiven Ergebnissen, wobei im LLNA eine stärkere Wirkung beobachtet wurde.
- *In vitro:* Die Bioverfügbarkeit der Substanz wird als gerade noch gut eingeschätzt, im Vergleich zu den anderen Härtern erscheint sie mittelmäßig.
- *In silico:* Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- **Gesamtbewertung: U → GMS**

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden.

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im reduzierten LLNA wurde ein EC3 Wert von 3,9 % (w/v) bzw. 297,2 mM ermittelt. Im KeratinoSens™ ergab sich ein positives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: 356 µM).

3.2.3.4 Trimethylhexamethylendiamin (TMD, Trimethylhexan-1,6-diamin), CASRN 25620-58-0, auch CASRN 25513-64-8

Diese CAS-Nummer 25620-58-0 bezeichnet ebenso wie CAS-Nummer 25513-64-8 das Isomergemisch aus 2,2,4-Trimethylhexan-1,6-diamin (CASRN 3236-53-1) und 2,4,4-Trimethylhexan-1,6-diamin (CASRN 3236-54-2).

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H302-H314-H317-H412 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der wenigen Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. In zwei GPMT und einem LLNA wurden stark positive Ergebnisse erhalten.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit der Substanz wird als gerade noch gut eingeschätzt, im Vergleich zu den anderen Härtern erscheint sie mittelmäßig.
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- **Gesamtbewertung: HS**

An aktuellerer Literatur liegt ein Lymph node cell count assay (LNCC) zu dieser Substanz vor (Kolle et al., 2012). Dieser Test ist eine Modifikation des LLNA, bei der nicht der Stimulationsindex des ³H-Thymidineinbaus, sondern die Zellzahlen im Lymphknoten ohne Einsatz radioaktiver Agenzien gemessen werden (siehe 1.2.1.4). Zum Vergleich wurden für die Testsubstanzen auch klassische LNAs durchgeführt, diese Ergebnisse sind ebenfalls berichtet. In der Auswertung bisheriger Vergleichsdaten erwies sich eine EC1,5 als Schwellenannahme für sensibilisierende Wirkung als vergleichbar zur EC3 im LLNA. Trimethylhexamethylendiamin wurde in beiden Tests mit Konzentrationen von 1, 3 und 10 % in Aceton getestet. Die EC1,5 im LNCC war 0,5 % (bei Stimulationsindices bis 3,42), die EC3 im LLNA allerdings mit 1,9 % etwas höher (bei Stimulationsindices bis 8,86; Wert des LLNA entspricht des bereits in FP-0324 berichteten Wertes aus (Gamer et al., 2008)). Nach den Kriterien beider Tests ist die Substanz als sensibilisierend anzusehen (Kolle et al., 2012).

Die Substanz (CASRN 25513-64-8) war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im KeratinoSens™ ergab sich ein negatives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: nicht bestimmbar).

3.2.3.5 Triethylentetramin, CASRN 112-24-3

Einstufung: H302-H312-H314-H317-H412 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der wenigen Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Insgesamt 4 GPM Tests und ein Test nach Bühler zeigten positive Wirkung.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gering bis mittelmäßig eingeschätzt.
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- **Gesamtbewertung: HS**

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden. Obwohl eine Registrierung mit der Abgabefrist 2013 vorgesehen war findet sich keine IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH (stattdessen Hinweis auf Annex III, reduzierte Datenanforderungen für REACH 2018 unter bestimmten Bedingungen).

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im KeratinoSens™ ergab sich ein negatives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: nicht bestimmbar).

3.2.3.6 N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan, CASRN 109-55-7

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H226-H302-H312-H314-H317 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der wenigen Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Mehrere Meerschweinchentests zeigten positive Wirkung, jedoch mit eher geringer Wirkstärke. Im LLNA mit sieben unterschiedlichen Vehikeln wurden EC3 Werte zwischen 1,7 und > 10 % ermittelt. In sechs Versuchen resultierte daraus die Einstufung HS, in einem Fall die Zuordnung GMS.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als mittelmäßig eingeschätzt. In DPRA-Tests zeigte sich eine nur geringe Reaktivität (Cys: 10 %, Lys 0 %). Im h-CLAT zeigte sich qualitativ ein positives Ergebnis.
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- **Gesamtbewertung: U → GMS**

Die Substanz ist in einem neuen Ranking-System (Basketter et al., 2014) in Kategorie 2 (Strong intrinsic sensitising properties) klassiert (siehe Abschnitt 1.4.1). Dies steht etwas im Gegensatz zu einer Einschätzung derselben Autoren aus dem Jahr 2006, hier wurde die Substanz als moderat humansensibilisierend bezeichnet (Basketter und Kimber, 2006).

Mittlerweile veröffentlichte Daten sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17 **Neue Ergebnisse zu N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan**

Test	Ergebnis	Bemerkungen	Quelle
<i>in vivo</i>			
-			
<i>in vitro</i>			
DPRA	negativ Mittlere Depletion: 4,0 % (Cys:8,0, Lys: -2,1 %)	Peptidüberschuss 10- (Cys) bzw. 50-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h	(Hirota et al., 2015; Nukada et al., 2013; Takenouchi et al., 2015)
	negativ Mittlere Depletion: 5,1 % (Cys: 10,2, Lys: 0 %)	Peptidüberschuss 10- (Cys) bzw. 50-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h	(Natsch et al., 2013)
Keratino Sens TM	positiv EC1,5: 85,76 µM EC3: 472,42 IC50: 1337,9		(Natsch et al., 2013)
	negativ EC1,5: -	Siehe auch Kapitel 5	Testung innerhalb dieses Projekts (FP-0384)
h-CLAT	positiv EC1,5 (CD86):82,1 EC2,0 (CD54): 165,8 CV75 (Zytotox.): 276,7 µg/mL		(Ashikaga et al., 2010; Hirota et al., 2015; 2013; Nukada et al., 2012; Takenouchi et al., 2015; Tsujita-Inoue et al., 2014)
MUSST	negativ EC1,5: > 7000 µM		(Natsch et al., 2013)
<i>in silico</i>			
DEREK	positiv	Substanz ist Teil des Trainingssets	(Nukada et al., 2013; Takenouchi et al., 2015)

3.2.3.7 Tetraethylenpentamin, CASRN 112-57-2

Einstufung: H302-H312-H314-H317-H411 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der wenigen Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Zwei Versuche an Meerschweinchen kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Die Substanz war Teil der vergleichenden Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke von Leung und Auletta (1997).
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gering eingeschätzt.

- *In silico*: Mögliches Pro-Hapten (Toxtree: Schiff Basenbildner; QSAR Toolbox: keine Metaboliten)
- **Gesamtbewertung: GMS**

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden. Obwohl eine Registrierung mit der Abgabefrist 2013 vorgesehen war findet sich keine IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH (stattdessen Hinweis auf Annex III, reduzierte Datenanforderungen für REACH 2018 unter bestimmten Bedingungen).

Eine neue Analyse in der QSAR Toolbox (v.3.4) ermittelt fünf mögliche Metaboliten der Substanz, davon wurden drei als Schiff Basenbildner identifiziert. Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im KeratinoSensTM ergab sich ein negatives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: nicht bestimmbar).

3.2.3.8 Pentaethylenhexamin, CASRN 4067-16-7

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H302-H312-H314-H317-H410 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde liegen nicht vor. Ein GPMT zeigte ein positives Ergebnis. Die Substanz war Teil der vergleichenden Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke von Leung und Auletta (1997).
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gering eingeschätzt.
- *In silico*: Mögliches Pro-Hapten (Toxtree: Schiff Basenbildner; QSAR Toolbox: keine Metaboliten)
- **Gesamtbewertung: GMS**

Aktuellere Daten konnten nicht gefunden werden.

Eine neue Analyse in der QSAR Toolbox (v.3.4) ermittelt fünf mögliche Metaboliten der Substanz, davon wurden drei als Schiff Basenbildner identifiziert.

3.2.3.9 Polyethylenpolyamin, CASRN 68131-73-7

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H302-H312-H314-H317-H410 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde liegen nicht vor. Ein GPMT zeigte ein positives Ergebnis.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gering eingeschätzt.
- *In silico*: Mögliches Pro-Hapten (Toxtree: Schiff Basenbildner; QSAR Toolbox: keine Metaboliten)
- **Gesamtbewertung: GMS** (Einschränkung: nur gültig bei < 0.1 % Monomergehalt)

Aktuellere Daten konnten nicht gefunden werden.

Eine neue Analyse in der QSAR Toolbox (v.3.4) ermittelt fünf mögliche Metaboliten der Substanz, davon wurden drei als Schiff Basenbildner identifiziert.

3.2.3.10 Polyethylenamin, CASRN 26336-38-9 (Monomer CASRN 593-67-9)

Einstufung: H302-H312-H314-H317-H410 (Hersteller Einstufung nach FP-0324)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde oder Tierdaten liegen nicht vor.
- *In vitro*: Es liegen keine Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen vor. Die Bioverfügbarkeit wurde als gering eingeschätzt.
- *In silico*: Mögliches Pro-Hapten (Toxtree: Schiff Basenbildner; QSAR Toolbox: keine Metaboliten)
- **Gesamtbewertung: GMS** (Einschränkung: nur gültig bei < 0.1 % Monomergehalt; Analogiebetrachtung zu anderen Aminen)

Aktuellere Daten konnten nicht gefunden werden (auch eine neue Analyse in der QSAR Toolbox (v.3.4) ergab keine neuen Informationen).

3.2.4 Härter, cycloaliphatische Amine

3.2.4.1 4,4'-Diaminocyclohexylmethan, CASRN 1761-71-3

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H302-H314-H411 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Beim Menschen wurden nur vereinzelt Sensibilisierungen beobachtet. Ein GPMT zeigte ein positives Ergebnis (GMS), zwei weitere Meerschweinchentests sind nicht bewertbar.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Keine Proteinreaktivität vorhergesagt (auch nicht für Metaboliten)
- **Gesamtbewertung: U → GMS**

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden. Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im KeratinoSens™ ergab sich ein negatives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: nicht bestimmbar).

3.2.4.2 Bis(4-(1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethylamino)-3-methylcyclohexyl)methan, CASRN 136210-32-7

Einstufung: H317-H410 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde oder Tierdaten liegen nicht vor.
- *in vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde je nach Parameter widersprüchlich abgeschätzt, insgesamt aber eher als gering erachtet.
- *In silico*: Keine Proteinreaktivität vorhergesagt (Metaboliten teilweise reaktiv)
- **Gesamtbewertung: U**

Mittlerweile liegt für diese Substanz ein Registrierungsdossier vor (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015). Dort findet sich eine Industriestudie zu einem GPMT gemäß OECD Guideline 406 (Klimisch RL 1). Die Induktion erfolgte intradermal mit 5% Testsubstanz, epikutan mit 50 % in Polyethylenglykol 400. Die erste Auslösebehandlung (nach 3 Wochen) wurde mit 5 %

durchgeführt, die zweite (nach 4 Wochen) mit 12 und 25 %. Bei der ersten Auslösung zeigten nach 48 h 17/20 Tieren Hautreaktionen, nach 72 h 9/20 Tieren. Bei der wiederholten Auslösebehandlung reagierten bei einer Konzentration von 25 % nach 48 h 10/20 Tieren, nach 72 h 4/20 Tieren. Für die 12 % Testgruppe waren es entsprechend 7/20 und 4/20 Tieren. Deshalb wurde die Substanz als sensibilisierend bewertet (unveröffentlichter Studienbericht, 1992; ESR.001). Es ist anzumerken, dass durch das gewählte Studiendesign (Verwendung einer intradermalen Induktionsdosis von > 1 %) formal keine Einstufung in die Kategorie HS erfolgen kann.

Als $\log K_{O/W}$ wird im Registrierungsdossier ebenfalls der mit EPI Suite™ berechnete Wert als Schlüsselstudie angegeben ($\log K_{O/W} = 5,99$), da die experimentelle Ermittlung mittels der gewählten Methodik (HPLC) nicht funktionierte.

3.2.4.3 N-Aminoethylpiperazin, 2-Piperazin-1-ylamin, CASRN 140-31-8

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H314-H317-H311-H318-H302-H412 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der wenigen Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Zwei Versuche an Meerschweinchen kamen zu positiven Ergebnissen, waren aber widersprüchlich die Wirkstärke betreffend.
- *in vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde noch als gut eingeschätzt, stellt aber im Vergleich zu den anderen cycloalipathischen Härtern die schlechteste Bewertung dar.
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- **Gesamtbewertung: U**

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden.

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im KeratinoSens™ ergab sich ein positives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: 231,9 µM).

3.2.4.4 Isophorondiamin (IPD), 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin, CASRN 2855-13-2

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H302-H312-H314-H317-H412 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Die Substanz ist beim Menschen als wichtiges Allergen bekannt, eine Wirkstärkenzuordnung ist nicht möglich. Drei Versuche an Meerschweinchen und ein LLNA zeigten stark positive Ergebnisse.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- **Gesamtbewertung: HS**

An aktuellerer Literatur liegt ein Lymph node cell count assay (LNCC) zu dieser Substanz vor (Kolle et al., 2012). Dieser Test ist eine Modifikation des LLNA, bei der nicht der Stimulationsindex des ³H-Thymidineinbaus, sondern die Zellzahlen im Lymphknoten ohne Einsatz radioaktiver Agenzien gemessen werden. Zum Vergleich wurden für die

Testsubstanzen auch klassische LLNAs durchgeführt, diese Ergebnisse sind ebenfalls berichtet. In der Auswertung bisheriger Vergleichsdaten erwies sich eine EC1,5 als Schwellenannahme für sensibilisierende Wirkung als vergleichbar zur EC3 im LLNA. Isophorondiamin wurde in beiden Tests mit Konzentrationen von 0,3, 1 und 3 % in Aceton getestet. Die EC1,5 im LNCC war 1,2 % (bei Stimulationsindices bis 2,94), die EC3 im LLNA 1,0 % (bei Stimulationsindices bis 20,2; Wert des LLNA entspricht des bereits in FP-0324 berichteten Wertes aus (Gamer et al., 2008)). Nach den Kriterien beider Tests ist die Substanz als sensibilisierend anzusehen (Kolle et al., 2012).

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im reduzierten LLNA wurde ein EC3 Wert von 4,1 % (w/v) bzw. 240,28mM ermittelt. Im KeratinoSensTM ergab sich ein positives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: 87,9 µM).

3.2.4.5 3-Cyclohexylaminopropylamin, CASRN 3312-60-5

Einstufung: H302-H314-H317 (Hersteller Einstufung aus FP-0324)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde oder Tierdaten liegen nicht vor.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)

Gesamtbewertung: U

Aktuellere Daten konnten nicht gefunden werden.

3.2.4.6 1,2-Diaminocyclohexan (DCH, Cyclohex-1,2-ylendiamin), CASRN 694-83-7

Einstufung: H302-H312-H332-H314-H335 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde liegen nicht vor. Versuche an Meerschweinchen und LLNAs kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- **Gesamtbewertung: U**

Mittlerweile liegt für diese Substanz ein Registrierungsdossier vor (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015). Die Selbsteinstufung des Joint Entry weicht wesentlich von der in FP-0324 genannten Einstufung ab (R34-43 entspricht H314 und H317): Acute Tox. 4 H302, Acute Tox. 4 H312, Acute Tox. 4 H332, Skin Corr. 1A H314, Eye Damage 1 H318. Hier wurde die Substanz also nicht mehr als sensibilisierend eingestuft, diese Wertung findet sich allerdings noch bei anderen Notifizierern.

Das Registrierungsdossier enthält keine Schlüsselstudie, als unterstützend (supporting-study, ESR.001) findet sich die bereits in FP-0324 referierte Studie von Gamer et al. (2008). Die Experimentatoren vermuten, dass ein klar positives Ergebnis aus dem LLNA in einer ersten Teilstudie mit Aceton als Vehikel eine Überschätzung der sensibilisierenden Wirkstärke darstellte. In einem unabhängigen Wiederholungsversuch und in einem weiteren Test mit dem Standardvehikel Aceton/ Olivenöl konnte die hohe Sensibilisierungsstärke nicht

bestätigt werden. Die Autoren selbst werten die Befunde als fraglich (weitere Details siehe FP-0324, Abschnitt 2.2.4.6).

Als zweite unterstützende Studie ist eine Industriestudie referiert, welche einen Intrakutan-test an Meerschweinchen beschreibt (unveröffentlichter Studienbericht, 1989; siehe ESR.002, keine Studie gemäß Guideline, Klimisch RL 2). Die epikutane Induktion erfolgte mittels eines Tropfens einer Emulsion von 10 % Testsubstanz in Wasser, zwei Tage später wurde mit intradermalen Injektionen von 0,1 mL einer 1 % Emulsion begonnen, welche insgesamt 4 Behandlungen in Abständen von einer Woche umfassten. Die Auslösebehandlung erfolgte nicht okklusiv 2 Wochen nach Abschluss der Induktionsphase, eine wiederholte Auslösebehandlung wurde eine Woche später durchgeführt. Appliziert wurde jeweils 1 Tropfen einer 1 oder 10 % Emulsion in Wasser. Bei der ersten Auslösebehandlung mit 10 % zeigten sich nach 24 oder 48 h jeweils bei 8/9 Tieren leichte bis mittelstarke Hautreaktionen. Da es zu diesen Zeitpunkten ebenfalls bei den nicht sensibilisierten Kontrolltieren zu leichten Hautreaktionen kam (3/5), wurde die Auslösebehandlung eine Woche später wiederholt. In der Testgruppe mit 10 % traten nach 48 h bei 6/9 Tieren leichte Rötungen auf (66 %), jedoch keine Effekte in der Negativkontrollgruppe. Die Testgruppe mit 1 % Emulsion blieb ohne Hautreaktionen. Nach Wertung der Autoren ist die Substanz aufgrund der Befunde bei wiederholter Auslösung ein schwacher Sensibilisierer (die Autoren des IUCLID-Datensatzes werten die Befunde als unklar).

Weiter werden noch insgesamt 3 Studien von Read-across-Substanzen mit negativen Befunden referiert (ESR.004 – ESR.006, zwei mit 2-Methyl-1,5-pentandiamin (CASRN 15520-10-2), eine mit Hexan-1,6-diamin (CASRN 124-09-4), alle nicht Guideline-konform).

An aktuellerer Literatur liegt ein Lymph node cell count assay (LNCC) zu dieser Substanz vor (Kolle et al., 2012). Dieser Test ist eine Modifikation des LLNA, bei der nicht der Stimulationsindex des ³H-Thymidineinbaus, sondern die Zellzahlen im Lymphknoten ohne Einsatz radioaktiver Agenzien gemessen werden. Zum Vergleich wurden für die Testsubstanzen auch klassische LLNAs durchgeführt, diese Ergebnisse sind ebenfalls berichtet. In der Auswertung bisheriger Vergleichsdaten erwies sich eine EC1,5 als Schwellenannahme für sensibilisierende Wirkung als vergleichbar zur EC3 im LLNA. 1,2-Diaminocyclohexan wurde in beiden Tests mit Konzentrationen von 0,3, 1 und 3 % in Aceton getestet. Die EC1,5 im LNCC war 0,6 % (bei Stimulationsindices bis 1,98), die EC3 im LLNA 0,4 % (bei Stimulationsindices bis 8,39; Wert des LLNA entspricht des bereits in FP-0324 berichteten Wertes aus (Gamer et al., 2008)). Nach den Kriterien beider Tests ist die Substanz als sensibilisierend anzusehen (Kolle et al., 2012).

3.2.5 Härter, sonstige

3.2.5.1 m-Xylidendiamin (MXDA), CASRN 1477-55-0

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H302-H332-H314-H317-H412-EUH071 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo:* Die Substanz ist beim Menschen als wichtiges Allergen bekannt, eine Wirkstärkenzuordnung ist nicht möglich. Versuche an Meerschweinchen kamen überwiegend zu positiven Ergebnissen, LLNA waren durchgängig positiv.
- *In vitro:* Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.

- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- **Gesamtbewertung: HS**

An aktuellerer Literatur liegt ein Lymph node cell count assay (LNCC) zu dieser Substanz vor (Kolle et al., 2012). Dieser Test ist eine Modifikation des LLNA, bei der nicht der Stimulationsindex des ³H-Thymidineinbaus, sondern die Zellzahlen im Lymphknoten ohne Einsatz radioaktiver Agenzien gemessen werden. Zum Vergleich wurden für die Testsubstanzen auch klassische LLNAs durchgeführt, diese Ergebnisse sind ebenfalls berichtet. In der Auswertung bisheriger Vergleichsdaten erwies sich eine EC1,5 als Schwellenannahme für sensibilisierende Wirkung als vergleichbar zur EC3 im LLNA. m-Xylidendiamin wurde in beiden Tests mit Konzentrationen von 0,3, 1 und 3 % in Aceton getestet. Die EC1,5 im LNCC war 0,4 % (bei Stimulationsindices bis 5,73), die EC3 im LLNA ebenfalls 0,4 % (bei Stimulationsindices bis 44,2; Wert des LLNA entspricht des bereits in FP-0324 berichteten Wertes aus (Gamer et al., 2008)). Nach den Kriterien beider Tests ist die Substanz als sensibilisierend anzusehen (Kolle et al., 2012).

Bei der *in silico* Modellierung der Proteinreaktivität (Toxtree und QSAR Toolbox) ergaben sich Unterschiede im Vergleich zum Ergebnis aus dem Vorgängerprojekt. Damals wurden 12 Metaboliten identifiziert, mittlerweile werden in der QSAR Toolbox (v.3.4) 20 mögliche Metaboliten identifiziert. Einige dieser Metaboliten werden über die verschiedenen bekannten Proteinbindungsmechanismen (SB, MA, S_N2) als proteinreaktiv erkannt. Die Modellierung in TOXTREE ergibt wie zuvor Hinweise auf die Schiffbasenbildung, aber auch auf Michael Addition und den Mechanismus der S_N2 Substitution (wie früher wird davon ausgegangen, dass es sich dabei um die Reaktivität von Metaboliten handelt, Vgl. FP-0324).

3.2.5.2 m-Xylidendiamin/Acrylnitril-Addukt, CASRN 73050-11-0

Einstufung: H302-H312-H317-H332 (Hersteller Einstufung aus FP-0324)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde oder Tierdaten liegen nicht vor.
- *In vitro*: Es liegen keine Daten vor.
- *In silico*: Befunde fehlen weil keine eindeutige Struktur zuzuordnen ist.
- Gesamtbewertung: U

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden. Obwohl zusätzlich die CASRN 90530-16-8 (übermittelt von Herrn Gahlmann der STAUF Klebstoffwerke GmbH) mit in die Datenrecherche eingeschlossen wurde (keine Registrierung unter REACH, keine Daten aus eChemPortal und ChemID plus; C&L inventory (14.12.2015) H317 SkinSens Cat 1).

Die Substanz (CASRN 90530-16-8) war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im reduzierten LLNA wurde ein negativer Testbefund erhalten (d.h. EC3 Wert > 10 % (w/v)). Im KeratinoSensTM ergab sich ein negatives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: nicht bestimmbar).

3.2.5.3 N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan, N-(3-(trimethoxysilyl)propyl)-ethylendiamin, CASRN 1760-24-3

Einstufung: H332-H318-H317 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde oder Tierdaten liegen nicht vor.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gering eingeschätzt.
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- **Gesamtbewertung: U**

Mittlerweile liegt für diese Substanz ein Registrierungsdossier vor (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015). Die Selbsteinstufung des Joint Entry weicht wesentlich von der in FP-0324 genannten Herstellereinstufung ab (R38-41-43-52/53): Eye Damage 1 H318, Skin Sens. 1 H317.

Das Registrierungsdossier enthält als Schlüsselstudie einen GPMT gemäß OECD Guideline 406 (Klimisch RL 1). Die Induktion erfolgte mittels intradermaler Injektionen mit 0.1 % in Paraffin, die epikutane Applikation mit 10 % Testsubstanz. Diese Konzentration wurde auch für die Auslösebehandlung verwendet. 24 und 48 h nach Auslösebehandlung zeigten 6/20 Tieren (30 %) eine positive Reaktion. Die Substanz wurde deshalb als sensibilisierend bewertet (unveröffentlichter Studienbericht, 1992; siehe ESR.001).

Als unterstützend wurde ein LLNA referiert. Konzentrationen der Testsubstanz von 5, 10, 25 und 50 % in Aceton/Olivenöl 3:1 bewirkten Stimulationindices von 1,7; 2,5; 4,7 und 7,9, entsprechend einer EC3 von 13 % (unveröffentlichter Studienbericht, 2005; siehe ESR.002, gemäß OECD Guideline 429, Klimisch RL 1).

Als unterstützend wurden ein weiterer GPMT berichtet (unveröffentlichter Studienbericht, 1987; siehe ESR.003, gemäß OECD Guideline 406, Klimisch RL 1). Intradermale Induktion erfolgte mit 0,5 % in Wasser, die epikutane Induktion und die Auslösebehandlung mit unverdünnter Testsubstanz. Bei der Testgruppe zeigten nach 24 und 48 h 20/20 Tieren Hautreaktionen, in der negativen Kontrolle reagierte keines der Tiere. Die Substanz wurde deshalb als sensibilisierend bewertet (ABER beachte mögliche Hydrolyse, siehe auch 3.3.2).

Als log $K_{O/W}$ werden im Registrierungsdossier aus technischen Gründen ebenfalls nur berechnete Werte präsentiert: die Modelle sind nicht genannt und liefern in einem Fall einen Wert von -0,3 und im anderen Fall einen Wert von -3,4.

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im KeratinoSensTM ergab sich ein negatives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: nicht bestimmbar).

3.2.5.4 Polyoxyalkylenamin, 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan, CASRN 2997-01-5

Einstufung: H312-H315-H318-H335-H317 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde oder Tierdaten liegen nicht vor.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde gerade noch als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- **Gesamtbewertung: U**

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden. Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im KeratinoSensTM ergab sich ein positives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: 118,3 μ M).

3.2.6 Säureanhydride

3.2.6.1 Phthalsäureanhydrid, CASRN 85-44-9

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H302-H315-H317-H318-H334-H335 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Versuche an Meerschweinchen und LLNA kamen durchwegs zu positiven Ergebnissen.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt. Die Proteinreaktivität in DPRA-Tests war hoch für Lysin-haltige Peptide und GSH als Substrat, niedrig für Cystein-haltige Peptide (Bereich zwischen 31 und 75 % für Lys, Cystein geringer, kombiniert beispielsweise 24 %). Tests auf die Keratinozytenreaktion erbrachten Testergebnisse, die in Richtung niedriger Reaktivität deuten. Ein MUSST zeigte ein negatives Ergebnis, zwei h-CLAT-Tests kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen. ,
- *In silico*: Proteinreaktivität über Acylierung
- **Gesamtbewertung: HS → SHS**

Mittlerweile veröffentlichte Daten sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18 **Neue Ergebnisse zu Phthalsäureanhydrid**

Test	Ergebnis	Bemerkungen	Quelle
<i>in vivo</i>			
GPMT	positiv (5/5 bei 0,1 %, 1/5 bei 0,01 %)	keine relevante Wirkungsverstärkung bei Koexposition mit DNCB oder TDI*	(Morimoto et al., 2014)
Mouse ear swelling test (MEST)	positiv (10 %)	keine relevante Wirkungsverstärkung bei Koexposition mit DNCB oder TDI*	(Morimoto et al., 2014)
<i>in vitro</i>			
DPRA	positiv Mittlere Depletion: 18,5 % (Cys: 0, Lys: 37 %)	Peptidüberschuss 10- (Cys) bzw. 50-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h mittelstark nach OECD 442C	(Hirota et al., 2015; Nukada et al., 2013; Takenouchi et al., 2015)
	positiv Mittlere Depletion: 38,5 % (Cys: 1,9, Lys: 75 %)	Peptidüberschuss 10- (Cys) bzw. 50-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h mittelstark nach den Kriterien der Autoren und OECD 442C	(Natsch et al., 2013)
	positiv Mittlere Depletion: 24 % (Cys: 31,3 Lys:)	Peptidüberschuss 15- (Cys) bzw. 3-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h mittelstark nach OECD 442C	(Bauch et al., 2012)

	16,7 %)		
PPRA	positiv (gesamt)	EC15 (Cys) > 15 mM (keine der Testkonzentrationen führt zu einer Depletion von mindestens 15 %) EC15 (Cys + HRP/P) = 0,07 mM EC15 (Lys) = 0,99 mM EC15 (Lys + HRP/P) = 1,65 mM	(Lalko et al., 2013)
ADRA (siehe Abschnitt 0)	positiv Mittlere Depletion: 42,7 % (Cys: 1,0, Lys: 84,4 %)	modifizierte Aminosäuren, Peptidüberschuss wie DPRA (10-fach für Cys, 50-fach für Lys), Reaktionszeit 24 h	(Fujita et al., 2014)
ADRA-DM (siehe Abschnitt 0)	positiv Mittlere Depletion: 47,5 % (Cys: -1,8, Lys: 96,9 %)	wie ADRA, mit 100-fach geringeren Konzentrationen an Testsubstanz, Reaktionszeit 24 h	(Yamamoto et al., 2015)
SH-Assay	positiv Maximale Depletion: 27,9 %	Es werden nur Werte bei Zytotoxizität < 50 % bestimmt	(Hirota et al., 2015; Hirota et al., 2013; Tsujita-Inoue et al., 2014)
ARE-Assay	negativ E1,5: > 3200 µg/mL Imax:1,08	Induktion > 1,50 des Kontrollwertes gilt als positives Ergebnis. Es werden nur Werte bei Zytotoxizität < 50 % bestimmt	(Hirota et al., 2015; Tsujita-Inoue et al., 2014)
KeratiNoSens™	negativ E1,5: -		(Bauch et al., 2012)
	negativ EC1,5: > 2000 µM EC3: > 2000 µM IC50: > 2000 µM		(Natsch et al., 2013)
LuSens	negativ E1,5: -		(Bauch et al., 2012)
	negativ E1,5: > 2400 µM		(Ramirez et al., 2014)
SENS-IS	positiv (1 % → stark sensibilisierend, gemäß den Wirkstärkeregelungen im LLNA)		(Cottrez et al., 2015)

U-SENS	negativ (EC150 und CV70 > 200 µg/mL)	Autoren bemerken das widersprüchliche Ergebnis zwischen LLNA und U-Sens (ohne Humandaten zur Verfügung zu haben)	(Piroird et al., 2015)
h-CLAT	negativ EC1,5 (CD86): - EC2,0 (CD54): - CV75 (Zytotoxizität): > 400 µg/mL	Es werden nur Werte bei Zytotoxizität < 50 % bestimmt	(Ashikaga et al., 2010; Hirota et al., 2015; 2013; Nukada et al., 2012; Takenouchi et al., 2015; Tsujita-Inoue et al., 2014)
MUSST	positiv EC1,5: 1080 µM		(Natsch et al., 2013)
EpiDerm™, SkinEthic RHE (SenCeeTox)	stark positiv auf Basis Transkriptom-Analysen der Keratinozytenreaktion in 3D-Hautmodellen	Qualitativ richtige, quantitativ falsche Zuordnung	(McKim et al., 2012)
<i>in silico</i>			
iSENS ver.2	schwach bis mittelstark vorhergesagte EC3 im LLNA: 12-21 %	unterschiedliche Werte in Abhängigkeit von Modellversion	(Tsujita-Inoue et al., 2014)
iSENS ver.2 (plus <i>in silico</i> Parameter)	stark vorhergesagte EC3 im LLNA: 0,77 %		(Tsujita-Inoue et al., 2015)
DEREK	positiv	Substanz ist Teil des Trainingssets	(Nukada et al., 2013; Takenouchi et al., 2015)

*: DNCB: Dinitrochlorbenzol; TDI Toluoldiisocyanat

3.2.6.2 Tetrahydrophthalsäureanhydrid, CASRN 85-43-8

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H317-H318-H334-H412 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde liegen nicht vor. Ein GPMT zeigte ein positives Ergebnis.
- *in vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.

- *In silico*: Proteinreaktivität über Acylierung (und Metabolit)
- **Gesamtbewertung: HS (in Analogie zu Phthalsäureanhydrid)**

Aktuellere Daten konnten nicht gefunden werden.

3.2.6.3 Hexahydrophthalsäureanhydrid, CASRN 85-42-7

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H318-H334-H317 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Ein GPMT und ein LLNA zeigten jeweils ein positives Ergebnis.
- *in vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Proteinreaktivität über Acylierung (und Metabolit)
- **Gesamtbewertung: HS (in Analogie zu Phthalsäureanhydrid)**

Mittlerweile veröffentlichte Daten sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19 **Neue Ergebnisse zu Hexahydrophthalsäureanhydrid**

Test	Ergebnis	Bemerkungen	Quelle
<i>in vivo</i>			
-			
<i>in vitro</i>			
DPRA	positiv Mittlere Depletion: 33 % (Cys: 15,7, Lys: 34,6 %)	Peptidüberschuss 10- (Cys) bzw. 50-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h grenzwertig mittelstark/stark nach den Kriterien der Autoren und OECD 442C	(Natsch et al., 2013)
PPRA	positiv (gesamt)	EC15 (Cys) > 10 mM (keine der Testkonzentrationen führt zu einer Depletion von mindestens 15 %) EC15 (Cys + HRP/P) = 4,34 mM EC15 (Lys) = 1,06 mM EC15 (Lys + HRP/P) = 1,03 mM	(Lalko et al., 2013)
Keratino Sens™	negativ EC1,5: > 2000 µM EC3: > 2000 µM IC50: > 2000 µM		(Natsch et al., 2013)
MUSST	positiv EC1,5: 1037 µM		(Natsch et al., 2013)
<i>in silico</i>			
-			

3.2.6.4 Methyltetrahydrophthalsäureanhydrid, CASRN 11070-44-3

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H317-H318-H334 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Es liegen keine Tierdaten vor.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Proteinreaktivität über Acylierung (und Metabolit)
- **Gesamtbewertung: U**

Aktuellere Daten konnten nicht gefunden werden.

3.2.6.5 Methylhexahydrophthalsäureanhydrid, CASRN 25550-51-0

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H317-H318-H334 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Es liegen keine Tierdaten vor.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Proteinreaktivität über Acylierung (und Metabolit)
- **Gesamtbewertung: U**

Aktuellere Daten konnten nicht gefunden werden.

3.2.7 Sekundäre und tertiäre Amine

3.2.7.1 3-((6-Aminotrimethylhexyl)amino)propionitril; N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin, CASRN 93941-62-9

Einstufung: H302-H314-H317 (Hersteller Einstufung aus FP-0324)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde oder Tierdaten liegen nicht vor.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- **Gesamtbewertung: U**

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden.

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im KeratinoSens™ ergab sich ein positives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: 414,4 µM).

3.2.8 Phenole

3.2.8.1 tert-Butylphenol, CASRN 98-54-4

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H315-H318-H361f (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Die Humandaten deuten darauf hin, dass der Inhaltsstoff eher ein seltenes Allergen ist. Eine Wirkstärkenzuordnung ist nicht möglich. Ein GPMT zeigte ein negatives Ergebnis.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Keine Proteinreaktivität vorhergesagt (auch nicht für Metaboliten)
- **Gesamtbewertung: GMS** (trotz spärlicher Datenlage, human seltenes Allergen, keine Sensibilisierung im Tierversuch und keine Proteinreaktivität vorhergesagt)

Aktuellere Daten konnten nicht gefunden werden.

Eine Information aus dem 2. Begleitkreistreffen besagt, dass die Substanz seit dem 1.1.2016 wegen der reprotoxischen Effekte nicht mehr vermarktet wird.

3.2.8.2 Bisphenol A, CASRN 80-05-7

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H318-H361f-H317-H335-H412 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Die Humandaten deuten darauf hin, dass der Inhaltsstoff eher ein seltenes Allergen ist. Eine definitive Wirkstärkenzuordnung ist nicht möglich. Ein GPMT und ein LLNA zeigten jeweils ein negatives Ergebnis.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Keine Proteinreaktivität vorhergesagt (auch nicht für Metaboliten)
- **Gesamtbewertung: GMS** (trotz spärlicher Datenlage, human seltenes Allergen, keine Sensibilisierung im Tierversuch und keine Proteinreaktivität vorhergesagt)

Aktuellere Daten konnten nicht gefunden werden.

3.2.8.3 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol, CASRN 90-72-2

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H302-H312-H315-H319-H317-H412 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Ein GPMT zeigte ein negatives Ergebnis.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Pro-Hapten (Metabolit, Schiff Basenbildner)
- Gesamtbewertung: U

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden.

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im KeratinoSensTM ergab sich ein negatives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: nicht bestimmbar).

Für diesen Inhaltsstoff wurde in der QSAR Toolbox zudem noch eine weitere Mechanistische Domäne bei den Protein Binding Alerts vorhergesagt (jeweils Michael Akzeptor und auch einige der 12 identifizierten Metaboliten reagieren nach diesem Mechanismus).

3.2.9 Reaktivverdünner

3.2.9.1 Butyl-glycidylether, CASRN 2426-08-6

Einstufung: H226-H351-H341-H332-H302-H335-H317-H412 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Im Human-Maximierungstest wird die Substanz als starkes Allergen bewertet. Ein GPMT sowie 2 LLNA zeigten positive Ergebnisse (alle Kategorie GMS).
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt. Die Substanz war Teil der im Vorgängerprojekt durchgeführten *in vitro* Testung (h-CLAT). Im DPRA war eine hohe Peptidreaktivität zu beobachten (Peptiddepletion 32,5 bis 84 %). Tests zur Keratinozytenreaktion kamen zu positiven Resultaten (Test 1: EC1,5 = 218,5 µM, I_{max} = 340,7 µM; Test 2: EC1,5 = 59 µM, I_{max} = 107 µM), ein h-CLAT war negativ.

- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- **Gesamtbewertung: GMS**

Die Substanz ist in einem neuen Ranking-System (Basketter et al., 2014) in Kategorie 3 (Known contact allergens) klassiert (siehe Abschnitt 1.4.1).

Mittlerweile veröffentlichte Daten sind in der folgenden Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20 **Neuere Ergebnisse zu Butyl-glycidylether**

Test	Ergebnis	Bemerkungen	Quelle
<i>in vivo</i>			
modifizierter rLLNA (siehe 1.2.1.1)	schwach positiv EC3: 31 %	Wert ähnlich der EC3 (18 %) eines klassischen LLNA aus der Literatur	(Roberts, 2015)
<i>in vitro</i>			
DPRA	positiv Mittlere Depletion: 60,3 % (Cys: 60,3, Lys: korrigiert 66 %, da überlappend mit Cys)	Peptidüberschuss 10- (Cys) bzw. 50-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h mittelstark nach OECD 442C	(Hirota et al., 2015; Nukada et al., 2013; Takenouchi et al., 2015)
	positiv Mittlere Depletion: 39,4 % (Cys: 67,3, Lys: 11,5 %)	Peptidüberschuss 10- (Cys) bzw. 50-fach (Lys), Reaktionszeit 24 h mittelstark nach Kriterien der Autoren & OECD 442C	(Natsch et al., 2013)
	positiv Mittlere Depletion: 33,86 % (Cys: 57,9, Lys: 4,15 %)	Mittelstark nach OECD 442C	Testung innerhalb dieses Projekts (FP-0384)
SH-Assay	positiv Max. Depletion: 50,1 %	Es werden nur Werte bei Zytotoxizität < 50 % bestimmt	(Hirota et al., 2015; 2013; Suzuki et al., 2009; Tsujita-Inoue et al., 2014)
ARE-Assay (ähnlich KeratinoSens TM)	positiv E1,5: 4,22 µg/mL I _{max} : 8,32	Induktion > 1,50 des Kontrollwertes gilt als positives Ergebnis. Es werden nur Werte bei Zytotoxizität < 50 % bestimmt	(Hirota et al., 2015; Tsujita-Inoue et al., 2014)
Keratino Sens TM	positiv EC1,5: 218,53 µM		(Natsch et al., 2013)
	positiv EC1,5: 48,89 µM		Testung innerhalb dieses Projekts (FP-0384)

LuSens	positiv EC1,5: < 72,34 µM		(Ramirez et al., 2014)
SENS-IS	positiv (1 % → stark sensibilisierend, gemäß den Wirk-stärkeregelungen im LLNA)	Autoren bewerten es als nicht relevant (zu hoch im Vgl. zum realen LLNA Ergebnis)	(Cottrez et al., 2015)
h-CLAT	negativ EC1,5 (CD86): - EC2,0 (CD54): - CV75 (Zytotox.): 185,3 µg/mL	Es werden nur Werte bei Zytotoxizität < 50 % bestimmt	(Ashikaga et al., 2010; Hirota et al., 2015; Hirota et al., 2013; Nukada et al., 2012; Takenouchi et al., 2015; Tsujita-Inoue et al., 2014)
MUSST	positiv EC1,5: 291,9 µM		(Natsch et al., 2013)
<i>in silico</i>			
iSENS vers.2	schwach bis mittelstark vorhergesagte EC3 im LLNA: 4,3-5,5 %	unterschiedliche Werte in Abhängigkeit von Modellversion	(Tsujita-Inoue et al., 2014)
iSENS vers. 2 (plus <i>in silico</i> Parameter)	schwach oder nicht sensibilisierend vorhergesagte EC3 im LLNA: 18 %	ANN Modell welches 3D-Molekülstruktur miteinbezieht	(Tsujita-Inoue et al., 2015)
DEREK	positiv	Substanz ist Teil des Trainingssets	(Nukada et al., 2013; Takenouchi et al., 2015)

3.2.9.2 1,4-Butandiol-diglycidylether, CASRN 2425-79-8

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H302-H312-H332-H319-H315-H317 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Die Substanz ist ein wichtiges Humanallergen und das zweithäufigste Allergen unter den Reaktivverdünnern. Meerschweinchentests zeigten teilweise widersprüchliche Ergebnisse.
- *in vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt. Die Substanz war Teil der im Vorgängerprojekt durchgeführten *in vitro* Testung (KeratinoSensTM & h-CLAT). KeratinoSensTM und h-CLAT zeigten ein positives Ergebnis.
- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- **Gesamtbewertung: HS**

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden.

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im DPRA ergab sich eine Cys-Depletion von 86,64 % und eine Lys-Depletion von 18,21 % (mittlere Depletion: 52,42 %).

3.2.9.3 Neopentylglykol-diglycidylether, CASRN 17557-23-2

Einstufung: H315-H317 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Ein GPMT zeigte ein positives Ergebnis.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt. Die Substanz war Teil der im Vorgängerprojekt durchgeführten *in vitro* Testung (KeratinoSens™ & h-CLAT). KeratinoSens™ und h-CLAT zeigten ein positives Ergebnis.
- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- **Gesamtbewertung: U**

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden.

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im DPRA ergab sich eine Cys-Depletion von 71,48 % und eine Lys-Depletion von 12,20 % (mittlere Depletion: 41,84 %).

3.2.9.4 2-Ethylhexyl-glycidylether, CASRN 2461-15-6

Einstufung: H315-H317 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde oder Tierdaten liegen nicht vor.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- Gesamtbewertung: U

Mittlerweile liegt für diese Substanz ein Registrierungsdossier vor (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015). Die Selbsteinstufung des Joint Entry weicht etwas von der in FP-0324 genannten Herstellereinstufung ab (R36/38-43-52/53): Skin Irrit. 2 H315, Skin Sens. 1A H317, d.h. Augenreizung und Ökotoxizität wurden nicht beibehalten.

Das Registrierungsdossier enthält als Schlüsselstudie einen Maurer Optimierungstest (unveröffentlichter Studienbericht, 1983; siehe ESR.001, gemäß OECD Guideline 406, Fassung von 1982, Klimisch RL 2). Intradermale und epikutane Induktion wurden mit 0,1 % Testsubstanz in 20 % Propylenglykol/80 % Salzlösung durchgeführt. Die erste, intradermale Auslösebehandlung (in der Zusammenfassung offensichtlich fälschlicherweise als epikutan beschrieben) erfolgte nach 2 Wochen mit derselben Konzentration, die Auswertung erfolgte nach 24 h. Dabei zeigten 18/20 Tieren positive Hautreaktionen. 10 Tage später erfolgte eine epikutane Auslösung mit 30 % Testsubstanz in Vaseline. 24 h danach zeigten 19/20 Tieren positive Hautreaktionen, nach 48 h 17/20 Tieren. Die Substanz wurde als sensibilisierend gewertet.

Als log K_{O/W} wurde im Registrierungsdossier experimentell ermittelt und ein Wert von 3,83 genannt.

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im DPRA ergab sich eine Cys-Depletion von 50,7 % und eine Lys-Depletion von 4,15 % (mittlere Depletion: 27,42 %). Im KeratinoSens™ ergab sich ein positives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: 28,81 µM).

3.2.9.5 1,6-Hexandiol-diglycidylether, CASRN 16096-31-4

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H315-H319-H317-H412 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Die Substanz ist ein wichtiges Humanallergen und das häufigste Allergen unter den Reaktivverdünnern. Ein Meerschweinchentest und ein LLNA zeigten positive Ergebnisse.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt. Die Substanz war Teil der im Vorgängerprojekt durchgeführten *in vitro* Testung (KeratinoSens™ & h-CLAT). KeratinoSens™ und h-CLAT kamen zu positiven Resultaten.
- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- **Gesamtbewertung: HS**

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden.

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im DPRA ergab sich eine Cys-Depletion von 83,89 % und eine Lys-Depletion von 15,94 % (mittlere Depletion: 49,92 %).

3.2.9.6 Versaticsäure-glycidylester (z.B. Cadura E 10) 2,3-epoxypropyl-neodecanoat, CASRN 26761-45-5

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H340-H317-H411 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Drei Meerschweinchentests zeigten positive Ergebnisse.
- *in vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- **Gesamtbewertung: GMS**

Aktuellere Daten konnten nicht gefunden werden.

3.2.9.7 Trimethylolpropan-Triglycidylether, CASRN 30499-70-8

Einstufung: H360-H314-H317-H411 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Tierdaten liegen nicht vor.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde noch als gut eingeschätzt, stellt aber im Vergleich mit den anderen Reaktivverdünnern die schlechteste Bewertung dar. Die Substanz war Teil der im Vorgängerprojekt durchgeführten *in vitro* Testung (KeratioSensTM & h-CLAT). KeratioSensTM und h-CLAT kamen zu positiven Resultaten.
- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- **Gesamtbewertung: U → HS**

Mittlerweile liegt für diese Substanz ein Registrierungsdossier vor (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015). Die Substanz wurde als sogenannte Multiconstituent substance registriert und als Reaction mass of 1-(2,3-epoxypropoxy)-2,2-bis ((2,3-epoxypropoxy)methyl) butane and 1-(2,3-epoxypropoxy)-2-((2,3-epoxypropoxy)methyl)-2-hydroxymethyl butane bezeichnet.

Das Registrierungsdossier enthält als Schlüsselstudie einen Maurer Optimierungstest (unveröffentlichter Studienbericht, 1976; siehe ESR.001, gemäß einer Guideline der US Association of Food and Drug Officials, Klimisch RL 2). Die Induktion erfolgte mit insgesamt 10 intradermalen Injektionen von 0,1 mL von 0,1 % Testsubstanz in Salzlösung an verschiedenen Stellen der Tiere (zum Teil mit Complete Bacto Adjuvans). 14 Tage später erfolgte die intradermale Auslösebehandlung mit 0,1 mL 0,1 % Testsubstanz in Salzlösung. Die Auswertung erfolgte über eine Messung der Hautdicke, wobei 5/20 Tieren positive Reaktionen zeigten. Bei der Induktionsbehandlung zeigten ebenfalls 5/20 Tieren positive Reaktionen (Reizwirkungen). Gemäß der Auswertungsmethodik dieses Tests ist damit keine sensibilisierende Wirkung zu unterstellen.

Weiter liegt ein Lymph node cell count assay (LNCC) zu dieser Substanz vor (Kolle et al., 2012). Dieser Test ist eine Modifikation des LLNA, bei der nicht der Stimulationsindex des ³H-Thymidineinbaus, sondern die Zellzahlen im Lymphknoten ohne Einsatz radioaktiver Agenzien gemessen werden. Zum Vergleich wurden für die Testsubstanzen auch klassische LLNAs durchgeführt, diese Ergebnisse sind ebenfalls berichtet. In der Auswertung bisheriger Vergleichsdaten erwies sich eine EC1,5 als Schwellenannahme für sensibilisierende Wirkung

als vergleichbar zur EC3 im LLNA. Trimethylolpropan-Triglycidylether wurde in beiden Tests mit Konzentrationen von 1, 3 und 10 % in Aceton getestet. Die EC1,5 im LLNC war 1,7 % (bei Stimulationsindices bis 2,87), die EC3 im LLNA 1,4 % (bei Stimulationsindices bis 12,0; Wert des LLNA entspricht des bereits in FP-0324 berichteten Wertes aus (Gamer et al., 2008) mit CASRN 3454-29-3). Nach den Kriterien beider Tests ist die Substanz als sensibilisierend anzusehen (Kolle et al., 2012).

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im DPRA ergab sich eine Cys-Depletion von 88,19 % und eine Lys-Depletion von 17,67 % (mittlere Depletion: 41,84 %).

3.2.9.8 C12/C14-Monoglycidylether, C12/C14-Alkylglycidylether, CASRN 68609-97-2

IUCLID Datensatz der Substanzregistrierung unter REACH verfügbar (Abgabefrist 2010).

Einstufung: H315-H317 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Tierdaten (Meerschweinchentests und LLNA) kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen.
- *In vitro*: Die Substanz war Teil der im Vorgängerprojekt durchgeführten *in vitro* Testung (KeratinoSens™ & h-CLAT). Der KeratinoSens™ zeigte ein positives, der h-CLAT ein negatives Ergebnis. Die Bioverfügbarkeit wurde als gering eingeschätzt.
- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- **Gesamtbewertung: U → GMS**

An aktuellerer Literatur liegt ein Lymph node cell count assay (LNCC) zu dieser Substanz vor (Kolle et al., 2012). Dieser Test ist eine Modifikation des LLNA, bei der nicht der Stimulationsindex des ³H-Thymidineinbaus, sondern die Zellzahlen im Lymphknoten ohne Einsatz radioaktiver Agenzien gemessen werden. Zum Vergleich wurden für die Testsubstanzen auch klassische LLNAs durchgeführt, diese Ergebnisse sind ebenfalls berichtet. In der Auswertung bisheriger Vergleichsdaten erwies sich eine EC1,5 als Schwellenannahme für sensibilisierende Wirkung als vergleichbar zur EC3 im LLNA. Der C12/C14-Monoglycidylether wurde in beiden Tests mit Konzentrationen von 1, 3 und 10 % in Aceton getestet. Die EC1,5 im LLNC war 0,7 % (bei Stimulationsindices bis 3,11), die EC3 im LLNA 0,6 % (bei Stimulationsindices bis 22,8; Wert des LLNA entspricht des bereits in FP-0324 berichteten Wertes aus (Gamer et al., 2008)). Nach den Kriterien beider Tests ist die Substanz als sensibilisierend anzusehen (Kolle et al., 2012).

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im DPRA ergab sich eine Cys-Depletion von 4,84 % und eine Lys-Depletion von -2,41 % (mittlere Depletion: 2,42 %).

3.2.9.9 Polypropylenglykol-diglycidylether/Polyoxypropylen-diglycidylether, CASRN 26142-30-3

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vitro*: Die Substanz war Teil der im Vorgängerprojekt durchgeführten *in vitro* Testung (KeratinoSens™ & h-CLAT). Weitere Details siehe Dipropylenglykol-diglycidylether, Abschnitt 3.2.9.11
- **Gesamtbewertung: U → GMS** (Übertrag von DiPG-DGE, CASRN 41638-13-5)

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden.

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im DPRA ergab sich eine Cys-Depletion von 51,21 % und eine Lys-Depletion von 7,21 % (mittlere Depletion: 29,21 %).

3.2.9.10 Polypropyleneglykol-chlormethyloxiran-Polymer, CASRN 9072-62-2

Einstufung: H315-H317-H319-H412 (ECHA, 2016a)

siehe Dipropylenglykol-diglycidylether, Abschnitt 3.2.9.11

- **Gesamtbewertung: U → GMS** (Übertrag von DiPG-DGE, CASRN 41638-13-5)

3.2.9.11 Dipropylenglykol-diglycidylether, CASRN 41638-13-5

Einstufung: H315-H317-H319-H335-H412 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Humanbefunde oder Tierdaten liegen nicht vor.
- *In vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde noch als gut eingeschätzt, im Vergleich zu den anderen Reaktivverdünnern liegt sie jedoch im unteren Bereich (MW : 246 g/mol). KeratinoSens™ und h-CLAT zeigten für Polypropylenglykol-diglycidylether (wurde als Testsubstanz gewählt, weil DiPG-DGE kommerziell nicht erhältlich war) positive Ergebnisse.
- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- **Gesamtbewertung: U**

Aktuellere Daten konnten nicht gefunden werden.

3.2.9.12 Cyclohexandimethanol-diglycidylether, CASRN 14228-73-0 /
Cyclohexandimethanol-divinylether CASRN 17351-75-6

Einstufung: H317 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

Es handelt sich um zwei unterschiedliche Substanzen

- *In vivo*: Für den Vinylether liegen keine Humanbefunde vor, für den Diglycidylether erlauben die Daten keine Aussage über die Wirkstärke. Tierdaten liegen nicht vor.
- *in vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt. Cyclohexandimethanol-diglycidylether (CASRN 14228-73-0) war Teil der im Vorgängerprojekt durchgeführten *in vitro* Testung (KeratinoSens™ & h-CLAT). Der KeratinoSens™ zeigte ein positives, der h-CLAT ein negatives Ergebnis.

- *In silico*: Diglycidylether - Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus; Divinylether – proteinreaktive Metbolite (Acylating Agent)
- **Gesamtbewertung: U / U**

Mittlerweile liegt für Cyclohexandimethanol-divinylether (CASRN: 17351-75-6) ein Registrierungsdossier vor (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015). Die Selbsteinstufung des Joint Entry weicht leicht von der in FP-0324 genannten Herstellereinstufung ab (R43-51/53): Skin Irrit. 2 H315, Skin Sens. 1 H317, Aquatic Acute 2 H401, Aquatic Chronic 2 H411. Die Neuklassierung beinhaltet eine Erweiterung um die hautreizende Wirkung.

Das Registrierungsdossier für Cyclohexandimethanol-divinylether enthält als Schlüsselstudie einen GPMT (unveröffentlichter Studienbericht, 1991; siehe ESR.001, gemäß OECD Guideline 406, Klimisch RL 1). Die Induktion erfolgte mittels intradermaler Injektion mit 30 % Testsubstanz in Paraffin, epikutan wurden am Tag 7 der Studie 10 % Natriumlaurylsulfat (Natriumdodecylsulfat, SDS) und am Tag 8 unverdünnte Testsubstanz appliziert. Die Auslösebehandlung erfolgte mit 30 % Vinylether in Paraffinöl oder unverdünnt. Die Darstellung der Ergebnisse im IUCLID scheint allerdings nicht korrekt: für die erste Ablesung nach 24 und 48 h sind jeweils zwei Datensätze für eine Konzentration von 30 % mit unterschiedlichen Inzidenzen für positive Hautreaktionen aufgeführt, vermutlich handelt es sich bei den Ergebnissen mit den höheren Inzidenzen (24 h: 19/20 Tieren, 48 h: 10/20 Tieren) um die Testgruppe mit 100 % Testsubstanz, für den zweiten Datensatz vermutlich tatsächlich um die 30 % Testgruppe (24 h: 10/20 Tieren, 48 h: 7/20 Tieren). Ungeachtet dessen erfüllen die beobachteten Effekte mit einer Häufigkeit > 30 % die Einstufung als sensibilisierend.

Der log K_{o/w} wurde im Registrierungsdossier für Cyclohexandimethanol-divinylether experimentell ermittelt und ein Wert von 3,65 (pH = 4,5) genannt. Zusätzlich wurde die EPI Suite™ Berechnung mit einem Wert von 3,032 berichtet.

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten für den Cyclohexandimethanol-diglycidylether (CASRN 14228-73-0) nicht gefunden werden.

3.2.9.13 p-tert-Butylphenol-monoglycidylether, CASRN 3101-60-8

Einstufung: H315-H317-H411 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Eine relativ hohe Sensibilisierungsquote bei einer eher geringen Verbreitung deutet auf starke humanallergene Wirkung. Ein LLNA kam zu positivem Ergebnis.
- *in vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt.
- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- **Gesamtbewertung: U**

Mittlerweile liegt für p-tert-Butylphenol-monoglycidylether ein Registrierungsdossier vor (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015). Die Selbsteinstufung des Joint Entry weicht leicht von der in FP-0324 genannten Herstellereinstufung ab (R36/38-43): Skin Irrit. 2 H315, Skin Sens. 1 H317, Aquatic Chronic 2 H411. Die Neuklassierung beinhaltet eine Erweiterung um die ökotoxikologische Wirkung.

Das Registrierungsdossier enthält als Schlüsselstudie den bereits in FP-0324 berücksichtigten LLNA von Gamer et al. (2008) mit positivem Ergebnis. Als unterstützend wird ein weiterer

LLNA referiert, welcher bei Konzentrationen von 25, 50 und 100 % in Aceton/Olivenöl 4:1 bei einem maximalen Stimulationsindex von 16,2 eine EC3 von 6,9 % berichtet. Die Substanz wurde als stark sensibilisierend bewertet (unveröffentlichter Studienbericht, 2011; siehe ESR.002, gemäß OECD Guideline 429, Klimisch RL 1).

An aktuellerer Literatur liegt ein Lymph node cell count assay (LNCC) zu dieser Substanz vor (Kolle et al., 2012). Dieser Test ist eine Modifikation des LLNA, bei der nicht der Stimulationsindex des ³H-Thymidineinbaus, sondern die Zellzahlen im Lymphknoten ohne Einsatz radioaktiver Agenzien gemessen werden. Zum Vergleich wurden für die Testsubstanzen auch klassische LLNAs durchgeführt, diese Ergebnisse sind ebenfalls berichtet. In der Auswertung bisheriger Vergleichsdaten erwies sich eine EC1,5 als Schwellenannahme für sensibilisierende Wirkung als vergleichbar zur EC3 im LLNA. p-tert-Butylphenol-monoglycidylether wurde in beiden Tests mit Konzentrationen von 0,3, 1 und 3 % in Aceton getestet. Die EC1,5 im LLNC war 0,5 % (bei Stimulationsindices bis 2,25), die EC3 im LLNA 0,4 % (bei Stimulationsindices bis 14,2; Wert des LLNA entspricht des bereits in FP-0324 berichteten Wertes aus (Gamer et al., 2008)). Nach den Kriterien beider Tests ist die Substanz als sensibilisierend anzusehen (Kolle et al., 2012).

Der log K_{OW} wurde im Registrierungsdossier experimentell ermittelt und ein Wert von 3,59 (pH = 7) genannt.

3.2.9.14 Phenyl-glycidylether, CASRN 122-60-1

Einstufung: H315-H317-H332-H335-H341-H350-H412 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Die Substanz wird als starkes Humanallergen eingeordnet. Meerschweinchentests und ein LLNA kamen zu positiven Ergebnissen.
- *in vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt. Die Substanz war Teil der im Vorgängerprojekt durchgeführten *in vitro* Testung (KeratinoSensTM & h-CLAT). Die Substanz zeigte in einem Peptiddepletionsversuch ähnlich dem DPRA eine hohe Reaktivität (Depletion 88 %). Der KeratinoSensTM zeigte ein positives (16 µM), der h-CLAT ein negatives Ergebnis.
- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- **Gesamtbewertung: HS → SHS**

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden.

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im DPRA ergab sich eine Cys-Depletion von 81,58 % und eine Lys-Depletion von 12,64 % (mittlere Depletion: 47,10 %). Im KeratinoSensTM ergab sich ein positives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: 16,10 µM).

3.2.9.15 o-Kresyl-glycidylether, Synonyme: 2,3-epoxypropyl-o-tolyl-ether; Glycidyl-2-methylphenylether CASRN 2210-79-9

Einstufung: H341-H315-H317-H411 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

siehe Isomerengemisch, Abschnitt 3.2.9.16

- **Gesamtbewertung: HS (Übertrag von CASRN 26447-14-3)**

Mittlerweile liegt für o-Kresylglycidylether ein Registrierungsdossier vor (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015). Die Selbsteinstufung des Joint Entry weicht wesentlich von der in FP-0324 genannten Herstellereinstufung ab (R38-68-43-51/53): Skin Sens. 1 H317, Aquatic Chronic 2 H411. Diese Selbsteinstufung wird parallel zur harmonisierten Einstufung (ECHA, 2016a; Abfrage August 2015) berichtet, welche mit der in FP-0324 genannten Herstellereinstufung identisch ist: Skin Irrit. 2 H315, Skin Sens. 1 H317, Muta. 2 H341 Aquatic Chronic 2 H411.

Die frühere Einschätzung der guten Bioverfügbarkeit wird durch die berichteten experimentellen Ergebnisse zur dermalen Absorption gestützt.

Das Registrierungsdossier enthält als Schlüsselstudie einen GPMT (unveröffentlichter Studienbericht, 1991; siehe ESR.001, gemäß OECD Guideline 406, Klimisch RL 1). Die Induktion erfolgte mittels intradermaler Injektion mit 5 % Testsubstanz in Vaseline, epikutan mit 10 %, die Auslösebehandlung mit nichtreizender Konzentration von 1 %. Bei der 24 h-Auswertung zeigten 16/20 Tieren positive Hautreaktionen, nach 48 h 14/20 Tieren. Die Substanz wurde bei 70-80 % positiv reagierenden Tieren als stark sensibilisierend bewertet.

Als unterstützend wurde ein weiterer GPMT gemäß OECD Guideline 406 referiert (Klimisch RL 2, da Substanzidentität nicht klar definiert). Intradermale und epikutane Induktion bzw. Auslösebehandlung wurden mit 3, 10 bzw. 3 % Testsubstanz in Vaseline durchgeführt. Bei der Auswertung nach 24 und 48 h zeigten alle Tiere positive Hautreaktionen, deshalb wurde die Substanz als extrem sensibilisierend bewertet (unveröffentlichter Studienbericht, 1989; siehe ESR.002).

Ein weiterer (älterer) aufgeführter unterstützender Meerschweinchentest ist mit konzeptionellen Mängeln behaftet. Die Ergebnisse deuten auf eine schwach sensibilisierende Wirkung hin (unveröffentlichter Studienbericht, 1976; siehe ESR.003). Diese Studie entspricht sehr wahrscheinlich der Studie, wie sie bereits in FP-0324 für das Isomerenmisch der Kresylglycidylether berichtet wurde.

Der log $K_{O/W}$ wurde im Registrierungsdossier experimentell ermittelt und ein Wert von 2,5 genannt.

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im reduzierten LLNA wurde ein EC3 Wert von 1,6 % (w/v) bzw. 97,4 mM ermittelt. Im DPRA ergab sich eine Cys-Depletion von 81,34 % und eine Lys-Depletion on 100 % (mittlere Depletion: 90,67 %). Im KeratinoSensTM ergab sich ein positives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: 15,39 μ M).

3.2.9.16 Kresyl-glycidylether, Isomerenmisch, CASRN 26447-14-3

Einstufung: H341-H315-H317-H411 (ECHA, 2016a)

Kurzzusammenfassung der Ergebnisse aus FP-0324:

- *In vivo*: Auf Basis der Humanbefunde ist eine Einschätzung der Wirkstärke nicht möglich. Tierdaten liegen für das ortho-Isomer nicht vor. Das Isomerenmisch war in zwei Meerschweinchentests positiv.
- *in vitro*: Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt. Der o-Kresyl-glycidylether war Teil der im Vorgängerprojekt durchgeführten *in vitro* Testung (h-CLAT). Der h-CLAT mit ortho-Isomer zeigte ein negatives Ergebnis.
- *In silico*: Proteinreaktivität über S_N2 Mechanismus
- Gesamtbewertung: HS

Aktuellere Daten aus der Literatur konnten nicht gefunden werden.

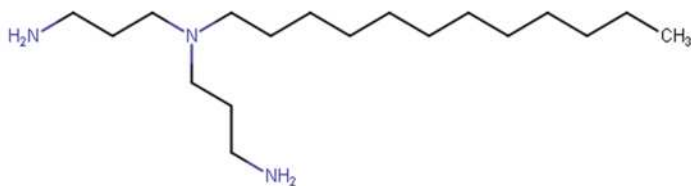
3.3 Neue Substanzen: Datendokumentation für Einzelstoffe

Dieser Abschnitt ist eine Zusammenstellung der Daten gemäß der Methodik von FP-0324 und umfasst Informationen der Schritte B bis D (experimentelle *in vivo* Daten, *in vitro* und *in silico* Daten). Humanerfahrungen werden im Rahmen eines gesonderten Abschnittes durch Herrn Geier zusammengestellt und fließen in den Arbeitsschritt 7 (Abschnitt 7) ein.

Wie bereits unter Abschnitt 2.1 erläutert, wird die Bewertung von Limonen zunächst zurückgestellt.

3.3.1 N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin, Bis(aminopropyl)laurylamin, CASRN 2372-82-9

Strukturformel



Aufgrund der Struktur ist die Substanz den aliphatischen Härtern zuzuordnen.

SMILES: N(CCCN)(CCCN)CCCCCCCCCCCC

Selbsteinstufung (Joint entry): Acute Tox. 3 H301, Skin Corr. 1B H314, STOT RE 2 H373 (kidney), Aquatic Acute 1 H400, Aquatic Chronic 1 H410 (ECHA, 2016a; Abfrage August 2015)

- *In vivo* (Schritt B)

Im Registrierungsdossier (ECHA, 2016b) wurde eine unveröffentlichte Industriestudie referiert. Es handelt sich um einen Buehler Test an männlichen Meerschweinchen gemäß EU-Methode B.6 (Klimisch RL 1) mit einem Produkt, welches 30 % der Testsubstanz enthielt. Die Expositionen erfolgten epikutan, okklusiv, für die Induktionsbehandlung wurde eine Konzentration von 1 % v/v (0,33 % Testsubstanz) in Wasser gewählt (im Vorversuch leicht reizend), für die Auslösebehandlung eine Konzentration von 0,5 % v/v (0,15 % Testsubstanz) in Wasser (im Vorversuch nicht reizend). 24 und 48 h nach Auslösebehandlung zeigte keines von 20 Tieren eine Hautreaktion. Deshalb wurde die Substanz als nicht sensibilisierend bewertet (unveröffentlichter Studienbericht, 1996; siehe ESR.001).

- *In vitro* (Schritt C)

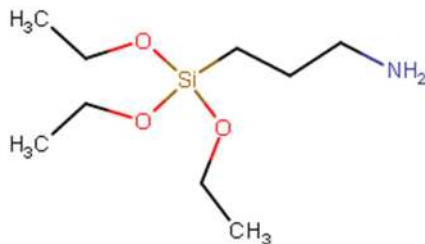
Im Registrierungsdossier sind weiterhin die Ergebnisse eines OECD 428 Studie (*in vitro* Skin Absorption) aufgeführt. Auf Basis der erzielten Ergebnisse (dermale Absorption innerhalb 24 h nur 0,92 %, steady state flux 0,0004 %/h) wird die dermale Absorption als gering eingeschätzt. In der EPI Suite™ wurde für den Verteilungskoeffizient (log $K_{O/W}$) ein Wert von 4,46 berechnet. Mit Hilfe dieses Wertes und des Molekulargewichts von 299,6 g/mol konnte anhand des DERMWIN Modells eine Abschätzung des Permeabilitätskoeffizienten (K_p) von 0,0302 cm/h gemacht werden. Es resultiert ein log K_p von -1,52.

- *In silico* (Schritt D)

In TOXTREE, mit den implementierten SMARTs Rastern, wird als Proteinreaktivitätsmechanismus des Inhaltsstoffes die Schiffbasenbildung vorhergesehen. Mit dem Wissen der begrenzten Anzeigemöglichkeit im TOXTREE Modul (hier wird Pro-Haptene der generelle Mechanismus zugeordnet, ohne die Vorstellung der Silbe „pro“ wie dies in der Originalveröffentlichung der Fall war) gehen wir davon aus, dass es sich bei Bis(aminopropyl)-laurylamin um das besagte Pro-Hapten handelt. Die, in der OECD Toolbox enthaltenen, Proteinbindungsmodelle der OECD und von OASIS konnten keine funktionelle Gruppe innerhalb der Struktur des Inhaltsstoffes finden, der Inhaltsstoff selbst wurde entsprechend als nicht-proteinreaktiv bezeichnet. Nach Anwendung des Metabolismus-Simulators wurde aber für jeweils 18 der 31 möglichen Metaboliten die Proteinreaktivität ebenfalls über einen Schiffbasenmechanismus vorhergesagt (Modell „Protein binding by OECD“ für Metaboliten: (17/18) MA: Direct Acting Schiff Base Formers|Mechanistic Domain: Schiff Base Formers|Mono-carbonyls; (1/18): Direct Acting Schiff Base Formers|Mechanistic Domain: Schiff Base Formers|1-3-Dicarbonyls; Modell „Protein binding by OASIS“ für Metaboliten: (3/14) Schiff base formation with carbonyl compounds >> aldehydes).

3.3.2 3-Aminopropyltriethoxysilan, CASRN 919-30-2

Strukturformel:



Aufgrund der Struktur ist die Substanz den sonstigen Härtern zuzuordnen.

SMILES: [Si](CCCN)(OCC)(OCC)OCC

Harmonisierte Einstufung: Acute Tox. 4* H302, Skin Corr. 1B H314 (ECHA, 2016a; Abfrage August 2015) (* Minimaleinstufung)

- *In vivo* (Schritt B)

Im Registrierungsdossier (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015) wurden drei unveröffentlichte Industriestudien referiert. Diese wurden auch in OECD (2003) ausführlich berichtet. Schlüsselstudie war ein Buehler Test an Meerschweinchen gemäß OECD Guideline 406 (Klimisch RL 1). Die Induktion erfolgte mit 20% Testsubstanz in Erdnussöl, die Auslösebehandlung mit 5%. Nach 24 h zeigten 3/20 Tieren Hautreaktionen, nach 48 h 7/20 Tieren. Deshalb wurde die Substanz als sensibilisierend bewertet (unveröffentlichter Studienbericht, 1997; ESR.001 und OECD, 2003). Weiterhin liegen zwei 2 GPMT Tests vor, welche keine sensibilisierende Wirkung beobachteten. Hierzu ist aber anzumerken, dass beide mit Testsubstanz in physiologischer Salzlösung (ESR.002, 1996, 0,25% intrad. Induktionskonz., 70% epikutane Induktions- und Auslösekonz.) bzw. wässriger Lösung (ESR.003, 1987, 0,5% intrad. Induktionskonz., 50% epikutane Induktions- und Auslösekonz.) durchgeführt wurden. Bei einer schneller Hydrolyse der Testsubstanz in diesen Medien

wurden de facto also nur die Hydrolyseprodukte (Ethanol und Trisilanol) getestet, die Ergebnisse sind für die Testsubstanz nicht als repräsentativ anzusehen (OECD, 2003).

- *In vitro* (Schritt C)

In der EPI Suite™ wurde für den Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) ein Wert von 0,31 berechnet. Mit Hilfe dieses Wertes und des Molekulargewichts von 221,4 g/mol konnte anhand des DERMWIN Modells eine Abschätzung des Permeabilitätskoeffizienten (K_p) von 0,000145 cm/h gemacht werden. Es resultiert ein $\log K_p$ von -3,84. Im Registrierungsdossier wurde mittels anderer QSAR-Methoden ein Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) von 1,7 berechnet. Verwendet man diesen Wert zur Berechnung, ergibt sich analog ein Permeabilitätskoeffizient (K_p) von 0,00121 cm/h und ein $\log K_p$ von -2,92.

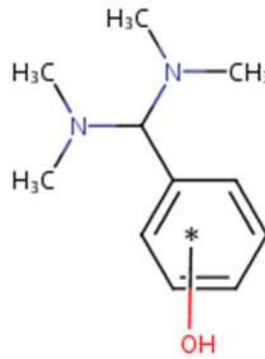
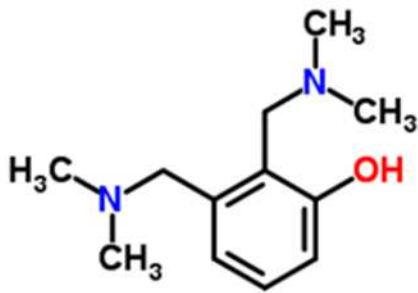
- *In silico* (Schritt D)

In TOXTREE, mit den implementierten SMARTs Rastern, wird als Proteinreaktivitätsmechanismus des Inhaltsstoffes die Schiffbasenbildung vorhergesehen. Mit dem Wissen der begrenzten Anzeigemöglichkeit im TOXTREE Modul (hier wird Pro-Haptene der generelle Mechanismus zugeordnet, ohne die Vorstellung der Silbe „pro“ wie dies in der Originalveröffentlichung der Fall war) gehen wir davon aus, dass es sich bei 3-Aminopropyltriethoxysilan um das besagte Pro-Hapten handelt. Die, in der OECD Toolbox enthaltenen, Proteinbindungsmodelle der OECD und von OASIS konnten keine funktionelle Gruppe innerhalb der Struktur des Inhaltsstoffes finden, der Inhaltsstoff selbst wurde entsprechend als nicht-proteinreaktiv bezeichnet. Nach Anwendung des Metabolismus-Simulators wurden 8 mögliche Metaboliten identifiziert. Einer dieser Metaboliten ist proteinreaktiv – ein Schiffbasenmechanismus wird vorhergesagt (Modell „Protein binding by OECD“ für Metaboliten: Direct Acting Schiff Base Formers|Mechanistic Domain: Schiff Base Formers|Mono-carbonyls; „Protein binding by OASIS v1.3“: Schiff base formation with carbonyl compounds >> aldehydes).

3.3.3 Bis[(dimethylamino)methyl]phenol, CASRN 71074-89-0

Strukturformel:

Für diese CAS-Nummer wurden unterschiedliche Strukturformeln gefunden. Die Substanzdatenbanken PubChem (NLM, 2016b; Abfrage August 2015), ChemSpider (Royal Society of Chemistry, 2016; Abfrage August 2015) und ChemicalBook (ChemicalBook Inc., ; Abfrage August 2015) weisen die linke der beiden gezeigten Formeln aus. Angesichts des Substanznamens scheint diese Struktur plausibel und wird für die Abschätzung der Hautpermeabilität verwendet. ChemIDplus (NLM, 2016a; Abfrage August 2015) und ChemNet weisen dagegen für dieselbe CAS-Nummer die rechte, davon abweichende Formel aus (siehe rechts). Diese scheint aber angesichts des angegebenen Synonyms 2,3-Bis[(dimethylamino)methyl]phenol nicht korrekt.



Aufgrund der Struktur ist die Substanz den Phenolen zuzuordnen-

SMILES: CN(C)Cc1cccc(c1CN(C)C)O, auch C1=CC=C(C(=C1O)CN(C)C)CN(C)C (beide korrekt)

Selbsteinstufung (Mehrzahl Notifizierer): Skin Corr. 1B H314 (ECHA, 2016a; Abfrage August 2015)

- *In vivo* (Schritt B)

Es sind keine Informationen verfügbar. Derzeit liegt für die Substanz noch keine Registrierung vor (avisiertes Registrierungsdatum war November 2010) (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015).

- *In vitro* (Schritt C)

In der EPI Suite™ wurde für den Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) ein Wert von 1,02 berechnet. Mit Hilfe dieses Wertes und des Molekulargewichts von 208,3 g/mol konnte anhand des DERMWIN Modells eine Abschätzung des Permeabilitätskoeffizienten (K_p) von 0,000505 cm/h gemacht werden. Es resultiert ein $\log K_p$ von -3,30.

- *In silico* (Schritt D)

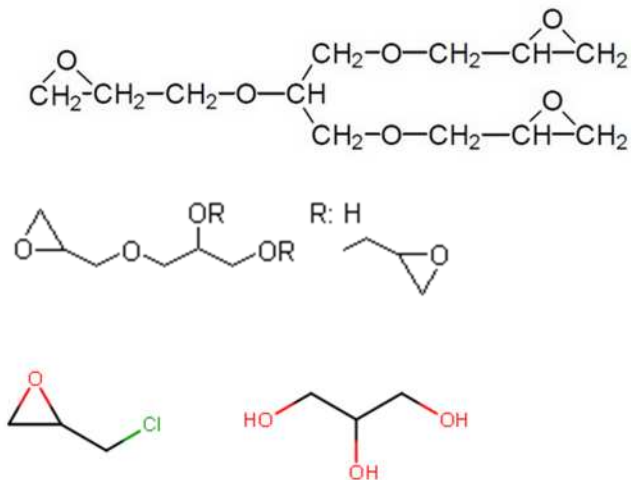
In TOXTREE wurde bezüglich der Proteinreaktivität des Inhaltsstoffes die Schiff Basenbildung als Mechanismus identifiziert. In der QSAR Toolbox wurde keine Proteinreaktivität gefunden. Der Skin metabolism simulator konnte 7 mögliche Metaboliten identifizieren, einer davon wurde als Proteinreaktiv nach dem Schiff Basen Mechanismus identifiziert.

3.3.4 Propantriolglycidylether (1,2,3-Propanetriol, glycidyl ethers bzw. 1,2,3-Propanetriol, polymer with 2-(chloromethyl)oxirane), CASRN 90529-77-4 / 25038-04-4

Strukturformel:

Dieses Polymer ist nicht exakt definiert. Die obere Strukturformel zeigt ein vollständig substituiertes Propantriol (1:3 Addukt), für diese CAS-Nummer (90529-77-4) findet sich auch eine Struktur von Reaktionsprodukten an nur einer (1:1 Addukt) oder zwei Alkoholfunktionen (mittlere Formel, R = H oder Methyloxiran) (chemBlink, 2016; Abfrage August 2015). Die CAS-Nummer 25038-04-4 wird teilweise zusammen mit obiger CAS-Nummer, getrennt für die gleichen Produkte, oder auch für die beiden Reaktanten (untere Formel) verwendet. Ein Registrierungsdossier liegt nur für die CAS-Nummer 90529-77-4 vor. Es ist einem Reaktionsprodukt mit variabler Zusammensetzung zugeordnet (UVCB: Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological

materials). Für die CAS-Nummer 25038-04-4 liegt eine Vorregistrierung mit einem geplanten Registrierungsdatum Mai 2018 vor.



Aufgrund der Struktur ist die Substanz den Reaktivverdünnern zuzuordnen. Es liegen jedoch auch Meldungen über Tests mit Harzen auf Basis der CAS-Nummer 25038-04-4 vor (siehe Teilbericht „Zusätzliche Humandaten – Literaturstudie“, IVDK.

SMILES: C1O[C@@H]1CCI.OCC(CO)O (CASRN: 25038-04-4)

Selbsteinstufung (Mehrzahl Notifizierer):

CASRN 90529-77-4: Acute Tox. 4 H302, Skin Irrit. 2 H315, Eye Irrit. 2 H319, Muta. 2 H341, Repr. 2 H361;

CASRN 25038-04-4: Skin Irrit. 2 H315, Eye Irrit. 2 H319, Resp. Sens. 1 H334, STOT SE 3 H335 (ECHA, 2016a; Abfrage August 2015)

- *In vivo* (Schritt B)

Im Registrierungsdossier (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015) für CAS-Nummer 90529-77-4 ist eine unveröffentlichte Industriestudie berichtet. Es handelt sich um einen LLNA Test gemäß OECD Guideline 429 (Klimisch RL 1). Auf Basis eines Vortests wurden Konzentrationen von 1, 2,5 und 5 % in Ethanol/Wasser getestet. Der maximale Stimulationsindex war 1,6, damit wurde die Substanz als nicht sensibilisierend bewertet (unveröffentlichter Studienbericht, 2006, ESR.001).

- *In vitro* (Schritt C)

In der EPI Suite™ wurde für den Verteilungskoeffizient (log $K_{O/W}$) ein Wert von -0,94 (für das 1:1 Addukt) bzw. -1,94 (für das 1:3 Addukt) berechnet. Der Wert von -1,94 findet sich auch in der QSAR-Berechnung des log $K_{O/W}$ im Registrierungsdossier (Wert ohne Chlor). Mit Hilfe dieses Wertes und des Molekulargewichts von 148,2 g/mol (für das 1:1 Addukt) bzw. 260,3 g/mol (für das 1:3 Addukt) konnte anhand des DERMWIN Modells eine Abschätzung des Permeabilitätskoeffizienten (K_p) von $5,46 \times 10^{-5}$ bzw. $2,8 \times 10^{-6}$ cm/h gemacht werden. Es resultieren log K_p -Werte von -4,26 bzw. -5,55.

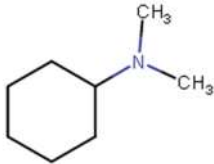
- *In silico* (Schritt D)

In TOXTREE wurde bezüglich der Proteinreaktivität des Inhaltsstoffes der S_N2 Mechanismus identifiziert. Dies war auch für die Anwendung der QSAR Toolbox der Fall. Die

Proteinreaktivität gegenüber Cystein wird als „moderat“ und gegenüber Lysin als „gering“ vorhergesagt (Profiler „DPRA Cystein/Lysin peptide depletion“ aus der QSAR Toolbox).

3.3.5 N,N-Dimethyl-cyclohexanamin, CASRN 98-94-2

Strukturformel:



Aufgrund der Struktur ist die Substanz ein cycloaliphatisches tertiäres Amin. Nachdem dieses nicht als Härter reagieren kann, fungiert es vermutlich als Katalysator.

SMILES: C1(CCCCC1)N(C)C

Selbsteinstufung (Joint entry): Acute Tox. 3 H301, Acute Tox. 3 H311, Skin Corr. 1B H314, Eye Dam. 1 H318, Acute Tox. 3 H331, Aquatic Chronic 2 H411 (ECHA, 2016a; Abfrage August 2015)

- *In vivo* (Schritt B)

Im Registrierungsdossier (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015) wurden drei unveröffentlichte Industriestudien berichtet, welche nach den Klimisch Kriterien alle als RL 2 eingestuft und in einem „Weight of evidence“ zur Bewertung herangezogen werden. Es handelte sich zum ersten um einen Meerschweinchenstudie ähnlich OECD Guideline 406 (ohne Positivkontrolle, kein Adjuvans verwendet, erste Applikation intradermal 1 %, zweite Applikation topisch 3 %, Auslöseapplikation topisch 1 %) mit intradermaler Applikation von 1 % wässriger Lösung (maximale nichtreizende Konzentration gemäß Vortest). Positive Hautreaktionen (Erytheme und Ödeme) zeigten sich nach 24 h in 3/20 Tieren, zu späteren Zeitpunkten mit geringeren Inzidenzen. Dies entspricht einer schwachen Reaktion (unveröffentlichter Studienbericht, 1996, ESR.001). Nach dem Registrierungsdossier ist diese Inzidenz von 15 % allerdings noch nicht ausreichend für eine Einstufung gemäß CLP (EC, 2008), wo eine Reaktion in mindestens 30 % der Tiere als Positivkriterium genannt ist. Dies ist nicht korrekt, da sich dieser Wert auf Tests mit Adjuvanzen bezieht, welche offensichtlich in dieser Studie nicht verwendet wurden. Für Studien ohne Adjuvans ist das Entscheidungskriterium mindestens 15 % positive Reaktionen, wie in der Studie beobachtet. Diese experimentellen Daten sprechen also für eine Einstufung als sensibilisierend.

Weiterhin wurde ein Buehler-Test referiert, bei dem eine Testsubstanz mit 20 % Amingehalt appliziert wurde. Es zeigten sich bei der Auslösebehandlung keine Hautreaktionen, während die Positivkontrolle Sensibilisierung verursachte (unveröffentlichter Studienbericht, 1998, ESR.003). Der dritte aufgeführte Test war ein LLNA mit 30 % Amin in Aceton/Olivenöl (4:1), als minimal reizende Konzentration. Weitere Konzentrationen wurden nicht getestet. Mehrere Testreihen ergaben einen maximalen Stimulationsindex von 2,45, also ein negatives Ergebnis (unveröffentlichter Studienbericht, 1996, ESR.002).

- *In vitro* (Schritt C)

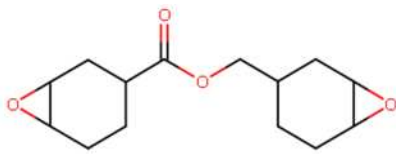
In der EPI Suite™ wurde für den $\log K_{O/W}$ ein Wert von 2,31 berechnet. Mit Hilfe dieses Wertes und des Molekulargewichts von 127,2 g/mol konnte anhand des DERMWIN Modells eine Abschätzung des Permeabilitätskoeffizienten (K_p) von 0,0103 cm/h gemacht werden. Es resultiert ein $\log K_p$ von -1,99. Im Registrierungsdossier findet sich ein experimentell ermittelter Wert für den Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) von 2,01. Analog zu obiger Berechnung ergibt sich für den experimentell bestimmten $\log K_{O/W}$ ein K_p von 0,00656 cm/h und ein $\log K_p$ von -2,18.

- *In silico* (Schritt D)

In TOXTREE wurde keine Proteinreaktivität des Inhaltsstoffes festgestellt. Und auch in der QSAR Toolbox wurde keine Proteinreaktivität gefunden. Der Skin metabolism simulator konnte zwei mögliche Metaboliten identifizieren, bei keinem wurde eine Proteinreaktivität identifiziert.

3.3.6 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat, CASRN 2386-87-0

Strukturformel:



Aufgrund der Struktur ist die Substanz den Reaktivverdünnern zuzuordnen. Es liegen jedoch auch Meldungen über Tests mit Harzen auf Basis der CAS-Nummer 2386-87-0 vor.¹⁸

SMILES:

O1[C@@H]2[C@@H]1CC[C@@H](C2)C(OC[C@@H]1C[C@@H]2[C@@H](CC1)O2)=O

Selbsteinstufung (Joint entry): Skin Sens. 1 H317 (ECHA, 2016a; Abfrage August 2015)

- *In vivo* (Schritt B)

Im Registrierungsdossier (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015) wurde eine unveröffentlichte Industriestudie berichtet. Es handelte sich um einen GPMT (Klimisch RL 2) mit intradermaler Induktion mit 5 % Testsubstanz in Propylenglykol (leicht nekrotisch wirkend) und epikutaner Induktion mit unverdünntem Material. Dieses wurde ebenso zur Auslösebehandlung verwendet. Positive Hautreaktionen zeigten sich nach 24 h in 12/19 Tieren, nach 48 h in 8/19 Tieren. Die Substanz wurde als mittelstark sensibilisierend gewertet (unveröffentlichter Studienbericht, 1991, ESR.001).

- *In vitro* (Schritt C)

In der EPI Suite™ wurde für den Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) ein Wert von 2,37 berechnet. Mit Hilfe dieses Wertes und des Molekulargewichts von 252,3 g/mol konnte anhand des DERMWIN Modells eine Abschätzung des Permeabilitätskoeffizienten (K_p) von 0,00226 cm/h gemacht werden. Es resultiert ein $\log K_p$ von -2,65. Im Registrierungsdossier

¹⁸ U.S. EPA, HIGH PRODUCTION VOLUME (HPV) CHEMICALS CHALLENGE PROGRAM TEST PLAN For Cycloaliphatic Epoxy Resin ERL-4221 CAS NO. 2386-87-0

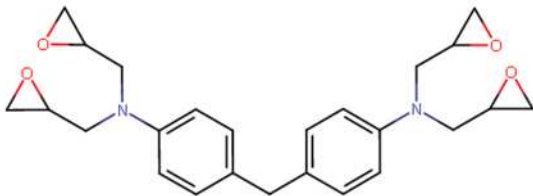
findet sich ein experimentell ermittelter Wert für den Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) von 1,34. Analog zu obiger Berechnung ergibt sich für den experimentell bestimmten $\log K_{O/W}$ ein K_p von 0,000467 cm/h und ein $\log K_p$ von -3,33.

- *In silico* (Schritt D)

In TOXTREE wurde bezüglich der Proteinreaktivität des Inhaltsstoffes der S_N2 Mechanismus identifiziert. Dies war auch für die Anwendung der QSAR Toolbox der Fall. Die Proteinreaktivität gegenüber Cystein wird als „moderat“ und gegenüber Lysin als „gering“ vorhergesagt (Profiler „DPRA Cystein/Lysin peptide depletion“ aus der QSAR Toolbox).

3.3.7 4,4'-Methylenbis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)anilin], 4,4'-Methylenebis(N,N-diglycidylanilin), TGMDA, CASRN 28768-32-3

Strukturformel:



Aufgrund der Struktur ist die Substanz den Reaktivverdünnern zuzuordnen.

SMILES:

O1[C@@H](CN(c2ccc(cc2)Cc2ccc(N(C[C@@H]3CO3)C[C@@H]3OC3)cc2)C[C@@H]2OC2)C1

Selbsteinstufung (Joint entry): Skin Sens. 1 H317 Aquatic Chronic 2 H411 (ECHA, 2016a; Abfrage August 2015)

- *In vivo* (Schritt B)

Im Registrierungsdossier (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015) wurde eine unveröffentlichte Industriestudie berichtet. Es handelt sich um einen LLNA gemäß OECD Guideline 429 (Klimisch RL 2) mit Expositionen von 10, 25 und 50 % in Dimethylformamid. Die höchste Konzentration bewirkte einen Stimulationsindex von 11,17 (unveröffentlichter Studienbericht, 2012, ESR.001), damit ist das Kriterium für eine Einstufung als sensibilisierend erfüllt.

- *In vitro* (Schritt C)

In der EPI Suite™ wurde für den Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) ein Wert von 2,53 berechnet. Mit Hilfe dieses Wertes und des Molekulargewichts von 422,5 g/mol konnte anhand des DERMWIN Modells eine Abschätzung des Permeabilitätskoeffizienten (K_p) von 0,00032 cm/h gemacht werden. Es resultiert ein $\log K_p$ von -3,49. Im Registrierungsdossier findet sich ein experimentell ermittelter Wert für den Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) von 2,12. Analog zu obiger Berechnung ergibt sich für den experimentell bestimmten $\log K_{O/W}$ ein K_p von 0,000171 cm/h und ein $\log K_p$ von -3,77.

- *In silico* (Schritt D)

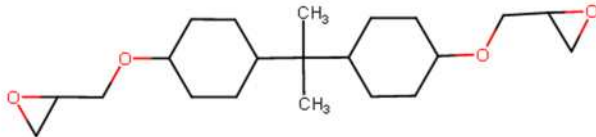
In TOXTREE wurde bezüglich der Proteinreaktivität des Inhaltsstoffes der S_N2 Mechanismus identifiziert. Dies war auch für die Anwendung der QSAR Toolbox der Fall. Die

Proteinreaktivität gegenüber Cystein wird als „moderat“ und gegenüber Lysin als „gering“ vorhergesagt (Profiler „DPRA Cystein/Lysin peptide depletion“ aus der QSAR Toolbox).

3.3.8 Epoxidharzmonomere (chemisch modifiziert)

Strukturformeln der modifizierten Bisphenol A- und Bisphenol F-Diglycidylether (O'Boyle et al., 2014), siehe auch Abschnitt 2.2:

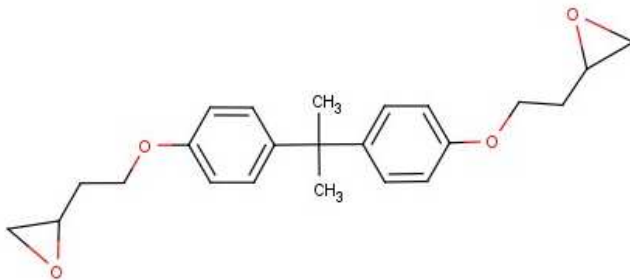
a)



Dieser Substanz ist eine CAS-Nummer (13410-58-7) zugeordnet, es handelt sich um 2,2'-((1-Methylethyliden)bis(cyclohexan-4,1-diylloxymethylen))bisoxiran.

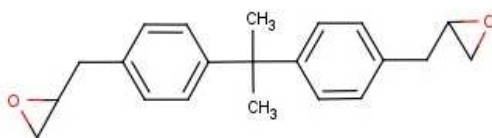
SMILES: O1[C@@H](COC2CCC(C(C3CCC(OC[C@@H]4OC4)CC3)(C)C)CC2)C1

b)



SMILES: CC(C)(C1=CC=C(OCCC2CO2)C=C1)C3=CC=C(OCCC4CO4)C=C3

c)



SMILES: CC(C)(C1=CC=C(CC2CO2)C=C1)C3=CC=C(CC4CO4)C=C3

- *In vivo* (Schritt B)

Getestet wurden diese mit dem LLNA (teilweise auch mit dem DPRA). Nachdem sowohl Bisphenol A- und Bisphenol F-Diglycidylether als auch die nichtaromatischen Derivate jeweils ähnliche EC3-Werte im LLNA aufwiesen, wurden nur noch die weiteren Modifikationen des Bisphenol F-Diglycidylether im LLNA getestet. Die eingesetzten maximalen Konzentrationen waren auf Basis von Vortests 20 % für die Bisphenol A-Derivate und 30 % für die Bisphenol F-Derivate. Die Ergebnisse des LLNA sind in der folgenden Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21 Vergleichende LLNA-Testung von modifizierten Epoxidharzkomponenten

	EC3 im LLNA (%)		EC3 im LLNA (%)
Bisphenol A-Diglycidylether	1,24	Bisphenol F-Diglycidylether	1,13
nichtaromatisch (a)	2,29	nichtaromatisch (analog a)	2,39
verlängerte Seitenkette (b)	nicht getestet	verlängerte Seitenkette (analog b)	2,21
verkürzte Seitenkette (c)	nicht getestet	verkürzte Seitenkette (analog c)	2,56

Damit zeigt sich, dass die modifizierten Bisphenol F-Diglycidylether im LLNA eine maximal um den Faktor 2,3 höhere EC3 als die Muttersubstanz aufweisen, entsprechend einer geringeren Wirkstärke der Sensibilisierung.

Das Derivat von Bisphenol A-Diglycidylether mit verkürzter Seitenkette (c) wurde noch zusätzlich in einem reduzierten LLNA (eine Konzentration getestet, Lymphknoten nicht „gepoolt“) geprüft. Bei gleicher molarer Konzentration (0,064 M) war der Stimulationsindex signifikant niedriger als bei der Muttersubstanz (arithmetisches Mittel 1,36 gegenüber 8,38, $p < 0001$). Eine Angabe einer EC3 ist bei dieser Versuchskonzeption nicht möglich.

- *In vitro* (Schritt C)

Im DPRA mit einem Cystein/Lysin-haltigen Peptid wurden nach einer Reaktionszeit von 80 min im Lösungsmittel DMSO/Phosphatpuffer folgende freie Restmengen an Peptid gefunden: Bisphenol F-Diglycidylether: 7,8 % (Depletion: 92,2 %), nichtaromatisches Derivat (analog a): 84 % (Depletion: 16 %), Derivat mit verlängerter Seitenkette (analog b): 68 % (Depletion: 32 %). Weitere Verbindungen wurden nicht im DPRA getestet. Die Ergebnisse zeigen damit eine deutlich verringerte Peptidreaktivität beider Varianten gegenüber der Muttersubstanz. Das nichtaromatische Derivat war dabei weniger reaktiv als dasjenige mit der verlängerten Seitenkette, was in der quantitativen Betrachtung analog zu den Ergebnissen des LLNA ist (höhere EC3 = geringere Wirkstärke).

In der EPI Suite™ wurden für die Verteilungskoeffizienten ($\log K_{O/W}$) Werte von 4,36 (a), 4,83 (b) und 4,78 (c) berechnet (Bisphenol A-Derivate). Mit Hilfe dieser Werte und Molekulargewichten von 352,5 (a), 368,5 (b) und 308,4 (c) g/mol konnte anhand des DERMWIN Modells Abschätzungen der Permeabilitätskoeffizienten (K_p) von 0,0196 (a), 0,0216 (b) und 0,0436 cm/h (c) gemacht werden. Es resultierten $\log K_p$ von -1,71 (a), -1,67 (b) und -1,36 (c).

- *In silico* (Schritt D)

In TOXTREE wurde bezüglich der Proteinreaktivität des Inhaltsstoffes der S_N2 Mechanismus identifiziert. Dies war auch für die Anwendung der QSAR Toolbox der Fall. Die Proteinreaktivität gegenüber Cystein wird als „moderat“ und gegenüber Lysin als „gering“ vorhergesagt (Profiler „DPRA Cystein/Lysin peptide depletion“ aus der QSAR Toolbox).

3.3.9 Formaldehyd, Polymer mit Benzenamin, hydriert, CASRN 135108-88-2

Strukturformel:

Es ist einem Reaktionsprodukt mit variabler Zusammensetzung (laut Registrierungsdossier UVCB: Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials), somit ist kein Struktur und kein SMILES verfügbar.

Selbsteinstufung (Joint Entry): Acute Tox. 4 H302, Skin Corr. 1C H314, Skin Sens. 1 H317, STOT RE 2 H373 (kidney, oral) H373 (liver and skeleton), Aquatic Chronic 3 H412 (ECHA, 2016a; Abfrage August 2015)

- *In vivo* (Schritt B)

Im Registrierungsdossier (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015) wird eine unveröffentlichte Industriestudie mit 4,4'-Methylen-dicyclohexanamin (CASRN 1761-71-3, siehe Abschnitt 3.2.4.1) als Bewertungsbasis herangezogen. Es handelt sich um den bereits in FP-0324 beschriebenen Buehler-Test an Meerschweinchen mit einer Provokationskonzentration von 2 % in Aceton/Dioxan (1:1) mit 13 % Meerschweinchenfett (keine Angaben zur Induktionskonzentration) und einer positiven Reaktion in 7/10 Tieren. Nach dem o.g. Registrierungsdossier erwies sich die Testsubstanz als schwach sensibilisierend.

- *In vitro* (Schritt C)

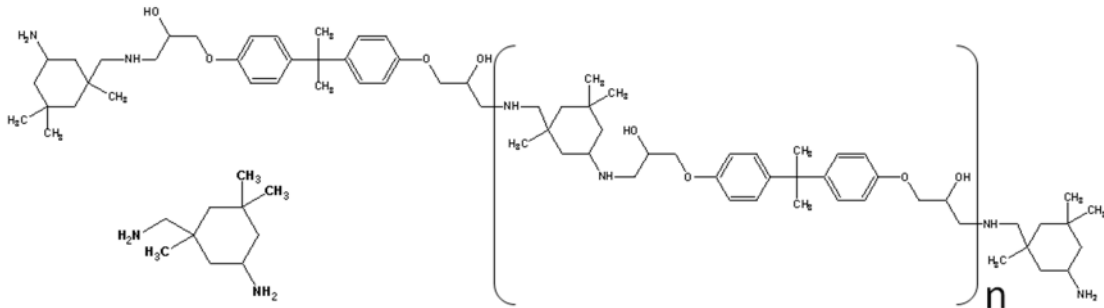
Nachdem die CAS-Nummer nicht in der Suite™ Software gelistet ist und keine Strukturformel für diese Substanz verfügbar war, konnten keine QSAR-Betrachtungen angestellt werden. Es kann keine Aussage zur Bioverfügbarkeit gemacht werden. Im Registrierungsdossier fehlt eine Aussage über das mittlere Molekulargewicht.

- *In silico* (Schritt D)

Modellierungen zur Proteinreaktivität fehlen weil keine eindeutige Struktur zuzuordnen ist. Als funktionelle Gruppen im Molekül sind hauptsächlich Amingruppen enthalten, in diesem Sinne ist wahrscheinlich eine mögliche Proteinreaktivität wie bei den restlichen Aminen nicht direkt sondern erst nach metabolischer Aktivierung möglich. Der Mechanismus der Reaktivität ist ggfs. ebenso wie bei den anderen Aminen die Schiff Basen Bildung.

3.3.10 Oligomerisierter Härter: 4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin, CASRN 38294-64-3

Strukturformel (aus Registrierungsdossier):



Diese Substanz ist wegen der endständigen primären Aminogruppen als Härter anzusehen, wegen unvollständiger Adduktbildung ist immer ein hoher Anteil an freiem Isophorondiamin (5-10 %) vorhanden.

SMILES (für Struktur mit $n = 0$):

```
CC1(C)CC(N)CC(C)(CNCC(O)COC2=CC=C(C=C2)C(C)(C)C3=CC=C(OCC(O)CNC4CC(C)(C)CC(C)(N)C4)C=C3)C1
```

Selbsteinstufung (Joint Entry): Skin Corr. 1B H314, Skin Sens. 1 H317; Eye Dam. 1 H318, Aquatic Chronic 3 H412 (ECHA, 2016a; Abfrage August 2015)

- *In vivo* (Schritt B)

Im Registrierungsdossier (ECHA, 2016b; Abfrage August 2015) werden keine Daten berichtet (Waiving, keine weiteren Angaben, vermutlich wegen korrosiver Wirkung). *In vivo* Daten wurde nicht gefunden. Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im reduzierten LLNA wurde ein negativer Testbefund erhalten (d.h. EC3 Wert > 10 % (w/v)).

- *In vitro* (Schritt C)

In der EPI Suite™ wurde für den Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) ein Wert von 6,64 berechnet. Mit Hilfe dieses Wertes und des Molekulargewichts von 667 g/mol konnte anhand des DERMWIN Modells eine Abschätzung des Permeabilitätskoeffizienten (K_p) von 0,00732 cm/h gemacht werden. Es resultiert ein $\log K_p$ von -2,14. Bei einem höheren Polymerisierungsgrad (Werte $n > 0$) ist eine geringere Hautpermeabilität zu erwarten. Im Registrierungsdossier findet sich ein experimentell ermittelter Wert für den Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) von 3,6. Analog zu obiger Berechnung ergibt sich für den experimentell bestimmten $\log K_{O/W}$ ein K_p von 0,0000699 cm/h und ein $\log K_p$ von -4,15.

Die Substanz war Teil der in diesem Projekt durchgeführten Testungen. Im KeratinoSens™ ergab sich ein negatives Testergebnis (siehe auch Kapitel 5, EC1,5: nicht bestimmbar).

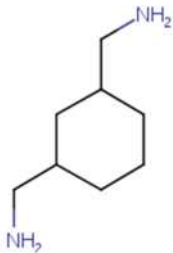
- *In silico* (Schritt D)

Modellierungen zur Proteinreaktivität fehlen weil keine eindeutige Struktur zuzuordnen ist. Da aber auch immer ein relevanter Anteil an freiem IPD vorhanden sein wird, kann davon ausgegangen werden, dass es sich ggfs. mechanistisch ebenfalls um ein Pro-Hapten handelt

(Metabolit, Schiff Basenbildner). Für die Struktur mit $n = 0$ fanden sich in Toxtree und der QSAR Toolbox keine Proteinreaktivität. Der Skin metabolism simulator konnte 54 mögliche Metaboliten identifizieren, davon 14 bzw. 13 nach dem Mechanismus der Schiff Basenbildung Proteinreaktiv (nach Protein binding by OASIS v1.3 bzw. nach OECD). Nach dem Modell der OECD konnte noch ein weiterer Mechanismus für weiter 5 dieser Metaboliten identifiziert werden (Nucleophilic addition | C-nitrosos compounds).

3.3.11 1,3-Cyclohexylen-bis-methylamin, 1,3-Cyclohexanedimethanamin, CASRN 2579-20-6

Strukturformel:



Aufgrund der Struktur ist die Substanz den cycloaliphatischen Härtern zuzuordnen.

SMILES: C1[C@@H](CCC[C@@H]1CN)CN

Selbsteinstufung (Joint entry, 28 Notifier): Acute Tox. 4 H302, Acute Tox. 4 H312, Skin Corr. 1A H314, Aquatic Chronic 3 H412 (ECHA, 2016a; Abfrage Mai 2016)

Anmerkung: Unter den zahlreichen Notifizierungen (insgesamt 275) finden sich 2 Gruppen (zusammen 48 Notifier), welche die Substanz als sensibilisierend (Skin Sens. 1 H317) einstufen.

- *In vivo* (Schritt B)

Im Registrierungsossier (ECHA, 2016b; Abfrage Mai 2016) wird als Schlüsselstudie ein GPMT mit negativem Ergebnis referiert. Bei diesem Test erfolgte die intradermale Induktion mit 0,05 % wässriger Lösung, die epikutane Induktion mit 5 % wässriger Lösung und die Auslösebehandlung mit 1 und 2 % wässriger Lösung. Dabei zeigte keines der Tiere eine allergische Reaktion.

In einer aktuellen Risikobewertung der Substanz (Matsumoto et al., 2015) ist der Endpunkt Sensibilisierung nicht berücksichtigt.

- *In vitro* (Schritt C)

In der EPI Suite™ wurde für den Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) ein Wert von 1,07 berechnet. Mit Hilfe dieses Wertes und des Molekulargewichts von 142,25 g/mol konnte anhand des DERMWIN Modells eine Abschätzung des Permeabilitätskoeffizienten (K_p) von 0,00128 cm/h gemacht werden. Es resultiert ein $\log K_p$ von -2,89. Im Registrierungsossier wurde in der Schlüsselstudie (OECD guideline 107) experimentell ein Verteilungskoeffizient ($\log K_{O/W}$) von 0,783 bei 21,5 °C bestimmt. Falls dieser Wert zur Berechnung verwendet wird, ergibt sich analog ein Permeabilitätskoeffizient (K_p) von 0,000826 cm/h und ein $\log K_p$ von -3,08.

- *In silico* (Schritt D)

In TOXTREE, mit den implementierten SMARTs Rastern, wird als Proteinreaktivitätsmechanismus des Inhaltsstoffes die Schiffbasenbildung vorhergesehen. Mit dem Wissen der begrenzten Anzeigemöglichkeit im TOXTREE Modul (hier wird Pro-Haptene der generelle Mechanismus zugeordnet, ohne die Vorstellung der Silbe „pro“ wie dies in der Originalveröffentlichung der Fall war) gehen wir davon aus, dass es sich bei Bis(aminopropyl)-laurylamin um das besagte Pro-Hapten handelt. Die, in der OECD Toolbox enthaltenen, Proteinbindungsmodelle der OECD und von OASIS konnten keine funktionelle Gruppe innerhalb der Struktur des Inhaltsstoffes finden, der Inhaltsstoff selbst wurde entsprechend als nicht-proteinreaktiv bezeichnet. Nach Anwendung des Metabolismus-Simulators wurden 12 mögliche Metaboliten identifiziert. Fünf dieser Metaboliten sind proteinreaktiv – ein Schiffbasenmechanismus wird vorhergesagt (Modell „Protein binding by OECD“ für Metaboliten: Direct Acting Schiff Base Formers|Mechanistic Domain: Schiff Base Formers|Mono-carbonyls; „Protein binding by OASIS v1.3“: Schiff base formation with carbonyl compounds >> aldehydes).

Die Proteinreaktivität der Metaboliten gegenüber Cystein wird als „gering“ vorhergesagt, wohingegen keine Reaktivität mit Lysin angenommen wird (Profiler „DPRA Cystein/Lysin peptide depletion“ aus der QSAR Toolbox).

3.3.12 Polyethylenpolytriethylentetramin, Amine, N-C12-18-alkyltrimethylendi-, diacetate, CASRN 90640-46-3

Strukturformel: nicht verfügbar

Als Amin ist die Substanz den Härtern zuzuordnen.

SMILES: nicht anwendbar

Selbsteinstufung (einziger Notifier): Acute Tox. 4 H302, Skin Irrit. 2 H315, Eye Irrit. 2 H319, Aquatic Acute 1 H400

Anmerkung: Bei einer Internetrecherche wurde in Sicherheitsdatenblättern zu Gemischen, welche die Substanz enthalten, diese Einstufung bestätigt. In keinem Fall lag eine Einstufung als sensibilisierend vor.

- *In vivo* (Schritt B)

Es sind keine Informationen verfügbar. Derzeit liegt für die Substanz noch keine Registrierung vor (avisiertes Registrierungsdatum war Mai 2013) (ECHA, 2016b; Abfrage Mai 2016). Bei einer ausführlichen Recherche konnten keine *in vivo* Daten gefunden werden.

- *In vitro* (Schritt C)

Nachdem die CAS-Nummer nicht in der Suite™ Software gelistet ist und keine Strukturformel für diese Substanz verfügbar war, konnten keine QSAR-Betrachtungen angestellt werden.

- *In silico* (Schritt D)

Es war keine Strukturformel für diese Substanz verfügbar, deshalb konnte der für *in silico* Betrachtungen notwendige Smiles-Code nicht erstellt werden.

3.3.13 Epoxy-Emulsion

Epoxy Emulsionen bestehen typischerweise aus Bisphenol-A/F-Harzgemisch ($M < 700$ g/mol) und einem Reaktivverdünner, z.B. C12-C14-Glycidylether in Wasser.

Zu diesem Gemisch liegen uns keine Daten vor.

Die Firma Sika (Sika Deutschland GmbH, Stuttgart) wollte den Prototypen einer solchen Substanz für eine Testung im Rahmen des Projekts zur Verfügung stellen.

Allerdings konnte dies nicht umgesetzt werden, da von Seitens der Firma Sika ein „möglichst realitätsnahen Test“ gefordert wurde („eine Testprozedur..., die eine Untersuchung der genannten Zielspezies ohne Schlepper (DMF, Aceton, Glycole...) ermöglicht. ...typischen Szenarien wie Spritzer auf der Haut resp. Kleidung mit nachfolgendem Hautkontakt unverfälscht nachbildet“).

Ein solcher Test konnte im vorliegenden Projekt nicht etabliert werden und somit stand uns keine Probe des Gemisches zur Verfügung.

Entsprechende Emulsionsgemische sind demnach nach den allgemeinen Regeln der Einzelstoffbewertung dieses Projekts (Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) in Verbindung mit der Gemiscebewertung (vgl. Abschnitt 8.3) einzuordnen.

Es wurde ebenfalls versucht, eine Bewertung von Epoxy-Knetmassen durchzuführen, die ohne eindeutigen Hinweis auf eine mögliche sensibilisierende Wirkung z.B. als „Repair-Express Power-Knete“ oder „Powerkitt“ in Baumärkten vertrieben werden. Nach Herstellerangaben sollen diese Projekte über die Anteile längerkettiger Harze „theoretisch“ keine Sensibilisierung auslösen, wurden jedoch bisher keinem angemessenen Test (mit dem Gemisch oder der hier eingesetzten Harzkomponente) unterzogen. Eine Testung wurde angestrebt, konnte jedoch im vorliegenden Projektrahmen nicht realisiert werden. Entsprechende Emulsionsgemische sind demnach nach den allgemeinen Regeln der Einzelstoffbewertung dieses Projekts (Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) in Verbindung mit der Gemiscebewertung (vgl. Abschnitt 8.3) einzuordnen.

4 ARBEITSSCHRITT 4: ZUSÄTZLICHE *IN VIVO* DATEN (HUMAN)

In diesem Arbeitsschritt wurden von Prof. Dr. Geier vom Informationsverbund Dermatologischer Kliniken (IVDK) zusätzliche Humandaten für die Gesamtinhaltsstoffliste recherchiert und berichtet. Die Ergebnisse sind in zwei Teilprojekten berichtet und finden sich in den Anhängen wider. Es liegen folgende Ergebnisse vor:

- Teilprojekt I: siehe Anhang 1 – Zusätzliche Humandaten – IVDK-Daten
- Teilprojekt II: siehe Anhang 2 – Zusätzliche Humandaten – Literaturstudie über allergologische Humanbefunde zu Inhaltsstoffen von Epoxidharzsystemen

5 ARBEITSSCHRITT 5: ZUSÄTZLICHE *IN VIVO* (TIER) UND *IN VITRO* TESTUNGEN¹⁹

Das generelle Vorgehen mittels *in vitro* Testbatterie wurde von der OECD durch die Veröffentlichung des sogenannten „Adverse outcome pathway“ (OECD, 2012a; b) nochmals bestätigt und findet sich mittlerweile ebenfalls im REACH Legaltext wieder (EC, 2016). Es wird zudem darauf hingewiesen, dass die Haptenisierungsreaktion abgeprüft im DPRA und die Tests, die sich auf den Keap1-Nrf2-ARE-Signalweg in Keratinozyten beziehen, ebenso wie der bewährte LLNA (Messung der T-Zellproliferation *in vivo*) sich besonders dazu eignen, auch quantitative Aussagen zu machen (Details siehe Kapitel 1).

5.1 Vorgehen zur Festlegung der Testbatterie

Wie bereits oben beschrieben war die Festlegung einer neuen Gesamtstoffliste, die es zu bewerten gilt, Gegenstand der 1. Begleitkreissitzung (September 2015) und den nachfolgenden Diskussionen. Auf Basis der Gesamtstoffliste, wie Sie in Tabelle 12 zu sehen ist, wurde eine Teststrategie, welche im Rahmen des vorgesehenen Budgets machbar ist, entwickelt.

Zunächst wurde der im Vorgängerprojekt entwickelte umfassende Testvorschlag berücksichtigt (siehe Teilprojekt 5.1a aus FP-0324; Heine et al., 2012). In FP-0324 wurde bereits eine Testserie durchgeführt. Ergebnisse aus dem KeratinoSensTM und aus dem h-CLAT konnten für acht bzw. zehn Reaktivverdünner nach den damals geltenden Standardprotokollen generiert werden. Diese Ergebnisse wurden für die Substanzbewertung bereits herangezogen.

Hintergründe für die Auswahl der Tests und Substanzen zur Testung im aktuellen Projekt waren die folgenden:

- Möglichst hoher Validierungsstatus der Tests (→ höhere Akzeptanz der Ergebnisse; Anmerkung: bisher wurde kein *in vitro* Test für die Wirkstärkenbetrachtung validiert).
- Verfügbarkeit von Laboren, die bereit sind im finanziellen und zeitlichen Rahmen zu kooperieren.
- Verfügbarkeit von Testmaterialien (käuflich zu erwerben oder kostenfrei von verschiedenen Unternehmen; beispielsweise konnte die avisierte Testung von PEHA (CASRN 4067-16-7) oder 3-Cyclohexylaminopropylamin (CASRN 3312-60-5) nicht durchgeführt werden, da das Testmaterial nicht (rechtzeitig) zur Verfügung stand).
- Relevanz der Inhaltsstoffe aus Sicht der Industrie und Berufsgenossenschaften.
- Welche Testergebnisse würden einen relativen Vergleich innerhalb der bestimmten Substanzgruppen mit hoher Wahrscheinlichkeit ermöglichen.

Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte wurden im Dezember 2015 folgende Testmaterialien bestellt und die entsprechenden Testungen beauftragt.

¹⁹ **Danksagung:** Die Durchführung dieses Testprogramms wurde durch Mithilfe vieler Beteiligter ermöglicht. Ein Dank für die finanzielle Unterstützung geht an die Allgemeine Unfallversicherungsanstalt (AUVA), Wien, DEUTSCHE BAUCHEMIE e.V., Frankfurt am Main, PlasticsEurope, Brüssel. Außerdem gilt unser Dank den verschiedenen Unternehmen, die kostenfrei Testmaterial zur Verfügung gestellt haben – Almirall Hermal GmbH, CTP Chemicals and Technologies for Polymers GmbH, Evonik Industries AG, MC-Bauchemie Müller GmbH & Co. KG und STAUF Klebstoffwerk GmbH. Besonderer Dank für die gute wissenschaftlichen Zusammenarbeit geht an die zuständigen Personen in den durchführenden Laboren, v.a. A. Natsch (Givaudan), J. Hargitai und D. Esdaile (CiToxLab, Hungary), sowie S. Kolle und B. Wareing (BASF).

5.1.1 DPRA

Tabelle 22 **Reaktivverdünner die in FP-0384 im DPRA getestet wurden**

Substance	CASRN	Quelle
Butyl-GE	2426-08-6	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 377031)
2-Ethylhexyl-GE	2461-15-6	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 251747)
C12/C14-Mono-GE	68609-97-2	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 412848)
Phenyl-GE	122-60-1	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 248487)
o-Kresylglycidylether	2210-79-9	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 340146)
1,4-Butanol-DGE	2425-79-8	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 220892)
Neopentylglykol-DGE	17557-23-2	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 338036)
1,6-Hexandiol-DGE	16096-31-4	Almirall Hermal GmbH (durch Kontakt von Herrn Geier)
Polypropylenglykol-DGE	26142-30-3	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 406732)
Trimethylolpropan-TGE	30499-70-8	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 430269)

Die Testung der Reaktivverdünner im DPRA ist sinnvoll, da es sich um direkte Haptene handelt, die keine Aktivierung vor der abgeprüften Peptidreaktion benötigen. Zudem wurden bereits verschiedene Glycidylether erfolgreich im DPRA getestet, sodass die Testmaterialien innerhalb der Anwendungsdomäne des Tests liegen. Für diese zehn Reaktivverdünner waren bereits Daten aus dem h-CLAT aus früheren Testungen vorhanden. Ebenso waren Daten aus dem KeratinoSens™ vorhanden bzw. wurden im vorliegenden Testprogramm generiert. Insgesamt soll somit eine Testbatterie von drei *in vitro* Tests für die Bewertung zur Verfügung gestellt werden. Die Verwendung von bereits nach dem Ranking eingestuften Substanzen (z.B. Butyl-GE oder Phenyl-GE) soll bei der Interpretation der Ergebnisse zumindest einen relativen Vergleich ermöglichen, da eine quantitative Aussage bezüglich der sensibilisierenden Wirkstärke nur begrenzt möglich ist.

5.1.2 KeratinoSens™

Tabelle 23 **Härter die in FP-0384 im KeratinoSens™ getestet wurden**

Substanz	CASRN	Quelle
Ethylendiamin (EDA)	107-15-3	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 03550)
Diethylentriamin (DETA)	111-40-0	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. d93856)
Dipropylentriamin	56-18-8	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. i1006)
Trimethylhexamethyldiamin (TMD)	25513-64-8 (25620-58-0)	Evonik Industries AG
Triethylentetramin	112-24-3	MC-Bauchemie Müller GmbH & Co. KG
N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan	109-55-7	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. d145009)

Substanz	CASRN	Quelle
Tetraethylenpentamin	112-57-2	MC-Bauchemie Müller GmbH & Co. KG
N-Aminoethyl-piperazin (AEP)	140-31-8	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. a55209)
N-cyanethyliertes Trimethylhexamethyldiamin	93941-62-9	CTP Chemicals and Technologies for Polymers GmbH
m-Xylyldiamin /Acrylonitril Adduct	73050-11-0	STAUF Klebstoffwerk GmbH (CAS 90530-16-8)
1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	2997-01-5	CHEMOS
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	90-72-2	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. a45348)
4,4'-Diaminocyclohexylmethan	1761-71-3	Evonik Industries AG
Isophorondiamin (IPD)	2855-13-2	Evonik Industries AG
N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	1760-24-3	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 104884)
Oligomerisierter Härter ²⁰	38294-64-3	MC-Bauchemie Müller GmbH & Co. KG

Die Testung der unterschiedlichen Härter soll die zur Bewertung herangezogene Datenlage verbessern. Die Testung der Amine im KeratinoSensTM ist sinnvoll, da es sich um Pro-Haptene handelt. Diese bedürfen einer metabolischen Aktivierung, um die abgeprüfte Peptidreaktion auszulösen. Die im Test verwendeten Keratinozyten besitzen eine gewisse metabolische Kapazität und sind demnach geeignet, um Pro-Haptene zu testen. Zudem wurden bereits verschiedene Amine erfolgreich im KeratinoSensTM getestet, sodass die Testmaterialien nachweislich innerhalb der Anwendungsdomäne des Tests liegen. Bei den Substanzen, die zusätzlich im LLNA geprüft werden, können die Ergebnisse möglicherweise quantitativ besser eingeschätzt werden.

Tabelle 24 **Reaktivverdünner die in FP-0384 im KeratinoSensTM getestet wurden**

Substance	CASRN	Quelle
Butyl-GE	2426-08-6	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 377031)
2-Ethylhexyl-GE	2461-15-6	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 251747)
Phenyl-GE	122-60-1	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 248487)
o-Kresylglycidylether	2210-79-9	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 340146)

Verschiedene Glycidylether (Reaktivverdünner) wurden bereits erfolgreich im KeratinoSensTM getestet (Testmaterialien liegen innerhalb der Anwendungsdomäne des Tests). Die Testung von 2-Ethylhexyl-GE und o-Kresylglycidylether im KeratinoSensTM liefert

²⁰ 4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin

Daten, sodass in Zusammenschau mit den Daten aus FP-0324 und den DPRA Daten aus diesem Projekt für die meisten Reaktivverdünner eine Testbatterie von drei *in vitro* Tests zur Verfügung steht. Die Verwendung von bereits nach dem Ranking eingestuften Substanzen (z.B. Ethylendiamin, Isophorondiamin, Butyl-GE oder Phenyl-GE) soll bei der Interpretation der Ergebnisse zumindest einen relativen Vergleich ermöglichen, da eine quantitative Aussage bezüglich der sensibilisierenden Wirkstärke nur begrenzt möglich ist.

5.1.3 LLNA (reduzierter Test)

Tabelle 25 Substanzen die in FP-0384 im reduzierten LLNA getestet wurden

Substanz	CASRN	Group	Quelle
o-Kreslyglycidylether	2210-79-9	RV (GE)	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. 340146)
Dipropylentriamin	56-18-8	Härter (aliphatisch)	Sigma-Aldrich (Prod-Nr. i1006)
m-Xylylendiamin /Acrylonitril Adduct	73050-11-0 (90530-16-8)	Härter (sonstige)	STAUF Klebstoffwerk GmbH
Isophorondiamin (IPD)	2855-13-2	Härter (cycloaliph.)	Evonik Industries AG
Oligomerisierter Härter ²¹	38294-64-3	Härter (sonstige)	MC Bauchemie Müller GmbH & Co KG

Die Projekte FP-0324 und FP-0384 zielen auf die Bereitstellung eines Rankings auf Basis der bestmöglichen Datengrundlage. Aufgrund der Änderungen im wissenschaftlichen Kenntnisstand wird besonderen Wert auf die Verwendung von *in vitro* Tests im Bereich der Hautsensibilisierung Wert gelegt. Die Durchführung einiger weniger Tierversuche schien sinnvoll, um die Frage des Einflusses der Vorhärtung von stark sensibilisierenden Inhaltsstoffen in Epoxidharzsystemen eindeutig zu klären. Die gewonnenen Ergebnisse sollen zudem dazu dienen, den wissenschaftlichen Kenntnisstand zu erweitern und die Entwicklung der *in vitro* Testungen zu fördern. Die Ergebnisse werden zu diesem Zweck den Entwicklern solcher Testsysteme zur Verfügung gestellt. In Zusammenarbeit mit den Wissenschaftlern im durchführenden Testlabor wurde festgestellt, dass ein von OECD Prüfvorschrift 429 abweichendes Protokoll ausreichend ist, um dem Zweck des Rankings im vorliegenden Projekt zu genügen. Die Reduktion der Anzahl der Testkonzentrationen auf zwei kritische Konzentrationen (2 und 10 % (w/v), jeweils Cut-off Werte für die Einordnung in die Gruppen HS und GMS) führt zur Reduktion der verwendeten Tierzahl und entspricht demnach einem der 3R Prinzipien nach Russel und Burch (1959).

Trotz der bekannten Probleme bei Verwendung des Standardvehikels Aceton/Olivenöl in Zusammenhang mit der Testung von Aminen im LLNA (Gamer et al., 2008)²² wurde im vorliegenden Test auf das Standardvehikel zurückgegriffen. Dies wurde aus Mangel an qualifizierten Alternativen und zur Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse mit bereits

²¹ Zusammensetzung des IPD-Polymer DBC-15-01: BzOH ca. 50 %, Rest-IPD ca. 5 - 10 %, Addukt ca. 38 - 44 %; mittleres Molekulargewicht ca. 1200 – 2000 Dalton, Viskosität ca. 4000 mPas (25°C); H-Eq: 225

²² Über die Schiff'sche Basen-Reaktion reagiert ein Metabolit des Amin mit Aceton (Imin Adukt). Das würde zur **Unterbewertung** der Wirkstärke führen, weil dann keine Reaktion der Metaboliten mehr mit den Keratinozyten stattfinden könnte.

vorhandenen Daten entschieden. Außerdem wird bei Verwendung der Ergebnisse zur Verbesserung der *in vitro* Tests gegenüber LLNA Ergebnissen das Standardvehikel bevorzugt.

5.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Unten findet sich jeweils eine kurze Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse pro Testsystem und eine kritische Einordnung sowie eine Diskussion der Probleme. Die ausführlichen Testberichte finden sich in Anhängen 3 bis 5 (Anhang 3 – Studienberichte der projektspezifischen *in vitro* Testung im DPRA, Anhang 4 – Studienbericht der projektspezifischen *in vitro* Testung im KeratinoSens™, Anhang 5 – Studienbericht der projektspezifischen Testung im LLNA).

5.2.1 DPRA

Im Vergleich zu den Vorhersagemodellen aus der OECD Prüfvorschrift 442C wurden vom Labor leicht unterschiedliche Vorhersagemodelle verwendet (siehe Tabelle 26, anhand der Laborspezifischen statistischen Auswertung von Daten). Diese beruhen auf der Eichung und Erfahrung des durchführenden Labors

Tabelle 26 **Verwendete Vorhersagemodelle der Testung durchgeführt in den Laboren der BASF SE (Ludwigshafen)**

a) Vorhersage anhand der mittleren Peptiddepletion [%] aus dem Versuchsansatz mit Cystein und Lysin

Mittlere Peptiddepletion [%]	Reaktivität	Bewertung
> 42,47	Hoch	positiv
> 22,62 - ≤ 42,47	Moderat	positiv
> 8,11 - ≤ 22, 62	Niedrig	positiv
> 4,65 - ≤ 8,11	Keine bis niedrig	Borderline ²³
<4,65	Keine oder minimale	negativ

²³ "The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 6.38 as "negative" (minimal or no reactivity) and mean depletions > 6.38 ≤ 22.62 as "positive" (low reactivity)."

b) Vorhersage anhand der Peptiddepletion [%] aus dem Versuchsansatz mit Cystein alleine

Cystein Depletion [%]	Reaktivität	Bewertung
> 98,24	Hoch	positiv
> 23,09 - ≤ 98,24	Moderat	positiv
> 17,28 - ≤ 23,09	Niedrig	positiv
> 10,50 - ≤ 17,28	Keine bis niedrig	Borderline ²⁴
< 10,50	Keine oder minimale	negativ

Allerdings stellt das leicht veränderte Vorhersagemodell im aktuellen Projekt kein Problem dar. Mit der Ausnahme von C12/C14–Mono-GE war bei allen getesteten Substanzen, bei denen ein Wert für die mittlere Peptiddepletion ausgewiesen wurde, diese im Bereich von > 29 %, d.h. die Vorhersage liegt klar im positiven Bereich und nur die Unterscheidung zwischen moderater oder hoher Peptidreaktivität steht aus. Die Grenze zwischen moderater und hoher Reaktivität in beiden Vorhersagemodellen ist gleich (42,47 %) und somit ergeben sich keine Unterschiede.

Dies gilt ebenso für das Vorhersagemodell nur auf Basis der Cysteindepletion. Bis auf den Wert für den C12/C14–Mono-GE zeigen alle Substanzen eine Cysteindepletion auf, die im Bereich von > 50 % liegt. Die Grenze hin zur Vorhersage einer hohen Peptidreaktivität ist auch in diesem Modell unverändert.

Probleme für die Testung ergaben sich bei einigen Substanzen durch die fehlenden Angaben zur Reinheit (bei C12/C14-Mono-GE, Neopentyl-DGE und Polypropylenglycol-DGE). In der Versuchsvorschrift wird gesagt, dass beispielsweise für UVCB Substanzen keine Vorhersage gemacht werden kann wegen den fehlenden Angaben bei solchen Substanzen und der im Test definierten und einzusetzenden Molverhältnisse. Für die Prüfung im Projekt wurde in den betreffenden Fällen von einer 100 %igen Reinheit ausgegangen, um die jeweilige Stammkonzentration von 100 mM zu erlangen.

²⁴ "The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 13.89 as "negative" (minimal or no reactivity) and mean depletions > 13.89 ≤ 23.09 as "positive" (low reactivity)."

Tabelle 27 Zusammenfassung der Ergebnisse im DPRA

Test substance name	Project	Cysteine-Peptide			Lysine-Peptide			mean of both depletions [%] ¹⁾	prediction model used for evaluation	Result (reactivity class)	remark on result	Final result
		mean depletion [%]	SD [%]	Samples with peptide visually solved	mean depletion [%]	SD [%]	Samples with peptide visually solved					
1,6-Hexandiol-DGE (s0347)	64V0569/05A052	83.89	1.66	yes	15.94	0.36	yes	49.92	cysteine 1:10 / lysine 1:50	high	-	positive
C12/C14-Mono-GE	64V0591/05A051	4.84	0.25	no	-2.41	0.42	no	2.42	cysteine 1:10 / lysine 1:50	minimal or no reactivity	reactivity class could be under-predicted due to to insolubility	Inconclusive
Butyl glycidyl ether	64V0349/13A509	57.99	2.43	yes	9.73	0.44	yes	33.86	cysteine 1:10 / lysine 1:50	moderate	-	positive
2-Ethylhexyl-GE	64V0574/15A197	50.70	2.01	no	4.15	0.41	no	27.42	cysteine 1:10 / lysine 1:50	moderate	reactivity class could be under-predicted due to to insolubility	positive
Phenyl-GE	64V0575/15A198	81.57	2.05	yes	12.64	0.48	yes	47.10	cysteine 1:10 / lysine 1:50	high	-	positive
o-Kresylglycidylether	64V0576/15A199	81.34	1.62	yes	100.00	0.00	no	90.67	cysteine 1:10 / lysine 1:50 ²⁾	high	-	positive
1,4-Butanol-DGE	64V0577/15A200	86.64	1.64	yes	18.21	0.62	yes	52.42	cysteine 1:10 / lysine 1:50	high	-	positive
Neopentylglykol-DGE	64V0578/15A201	71.48	2.52	yes	12.20	0.35	yes	41.84	cysteine 1:10 / lysine 1:50	moderate	-	positive
Polypropylenglykol-DGE	64V0579/15A202	51.21	2.14	yes	7.21	0.29	yes	29.21	cysteine 1:10 / lysine 1:50	moderate	-	positive
Trimethylolpropan-TGE	64V0580/15A203	88.19	1.34	yes	17.67	0.25	no	-	cysteine 1:10	moderate	-	positive

1) negative Werte werden als null gewertet, 2) Bewertung nach dem Cystein 1:10 / Lysin 1:50 Modell kann anhand trotz der schlechten Löslichkeit im Versuch mit Lysin angewandt werden, auf Grund der eindeutigen Lysindepletion im Versuch

Anhand der in Tabelle 27 aufgeführten Ergebnisse lässt sich für die 10 getesteten Reaktivverdünner folgende Relativaussage treffen:

Sehr geringe Reaktivität – jedoch mit hoher Unsicherheit für:

- C12/C14-Mono-GE

Geringere Reaktivität und somit wahrscheinlich Wirkstärke von:

- 2-EH-GE
- Polypropylenglykol-DGE
- Butyl-GE

Höhere Reaktivität und somit wahrscheinlich höhere Wirkstärke von:

- Phenyl-GE
- 1,4-Butanol-DGE
- Neopentylglykol-DGE
- 1,6-Hexandiol-DGE

Höhere Reaktivität – jedoch mit größerer Unsicherheit für:

- Trimethylolpropan-TGE
- o-Kresylglycidylether

Die „größere Unsicherheit“ bei der Bewertung mancher Stoffe ergibt sich aus der Tatsache, dass es in einigen Versuchsansätzen zur Präzipitation der getesteten Inhaltsstoffe kam (bei Lysin: Trimethylolpropan-TGE, o-Kresyl-GE, C12/C14-Mono-GE, 2-EH-GE; bei Cystein: C12/C14-Mono-GE, 2-EH-GE). Die Verhältnisse im Versuchsansatz sind demnach nicht mehr eindeutig und es kann zu einer gewissen Unschärfe des Testergebnisses führen.

Diese relative Einordnung wurde stoffspezifisch jeweils betrachtet und in Zusammenschau mit anderen *in vitro* Ergebnissen bewertet (Kapitel 0).

5.2.2 KeratinoSens™

Insgesamt wurden 16 Härter (aliphatische und cycloaliphatische Amine, tertiäre Amine, Phenole, sonstige Härter) im KeratinoSens™ getestet.

Bei nur sechs Aminen wurde ein positives Testergebnis erzielt und eine relative Bewertung scheint ggfs. möglich (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28 Ergebnis für die im KeratinoSens™ überprüften und als positiv identifizierten Härter (Amine, alle Angaben in µM)

CASRN	Substanz	I _{max} ∅	Geo Mean EC1.5	Geo Mean EC2	Geo Mean EC3	Geo Mean IC50	Anzahl positiver Wdh
2855-13-2	Isophorondiamin (IPD)	13,83	82,3	100,4	132,4	533,4	2 of 3
140-31-8	N-Aminoethyl-piperazin (AEP)	2,01	124,3	n.i.	n.i.	2260,8	3 of 3
2997-01-5	1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	1,66	129,2	n.i.	n.i.	>2268.8	3 of 3
56-18-8	Dipropylentriamin	1,67	356,0	n.i.	n.i.	>3048.31	3 of 3
93941-62-9	N-cyanethyliertes Trimethylhexamethyldiamin	2,34	414,4	529,5	n.i.	913,1	2 of 3
107-15-3	Ethylendiamin (EDA)	4,70	489,0	686,1	1004,7	1532,5	3 of 3

Die folgenden 10 Amine wurden als negativ im KeratinoSens™ identifiziert und weisen nach unserem Verständnis somit in die Wirkstärkekategorie GMS (Tabelle 29).

Tabelle 29 Ergebnis für die im KeratinoSens™ überprüften und als negativ identifizierten Härter

CASRN	Substanz	I _{max} ∅	GeoMean IC50 [µM]	Anzahl positiver Wdh
111-40-0	Diethylentriamin (DETA)	1,22	3146,1	0 of 3
25513-64-8	Trimethylhexamethyldiamin (TMD)	1,25	987,1	0 of 3
112-24-3	Triethylentetramin (TETA)	1,38	1852,7	1 of 3
109-55-7	N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan	1,38	1410,9	0 of 3
112-57-2	Tetraethylenpentamin (TEPA)	1,06	43,3	0 of 3
73050-11-0	m-Xylyldiamin /Acrylonitril Adduct	1,11	>2017.1	0 of 3
90-72-2	2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	1,21	968,5	0 of 3
1761-71-3	4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM)	1,06	290,1	0 of 3
1760-24-3	N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	1,31	>1798.6	0 of 3
38294-64-3	Oligomerisierter Härter	0,94	not applicable	0 of 3

Bei zwei Substanzen wurde allerdings eine starke Zytotoxizität beobachtet, deswegen ist das negative Ergebnis nicht eindeutig zu werten

- Tetraethylenpentamin
- Oligomerisierter Härter

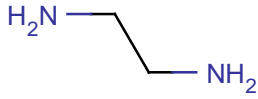
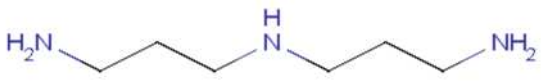
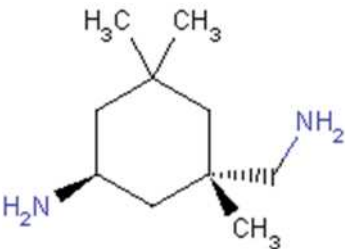
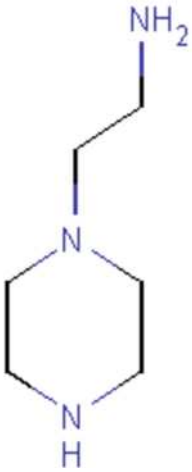
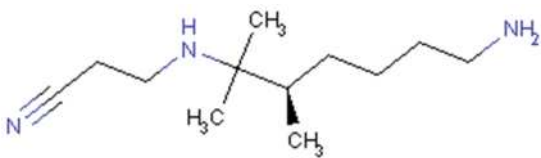

<p>Ethylendiamin (EDA) – aliphatisches Amin</p> 	<p>Dipropylentriamin – aliphatisches Amin</p> 
<p>IPD – cycloaliphatisches Amin</p> 	<p>N-AEP – cycloaliphatisches Amin</p> 
<p>N-cyanethyliertes TMD – tertiäres Amin</p> 	<p>1,10-Diamino-4,7,dioxadecan – sonstige Härter</p> 

Abbildung 11 Strukturformeln der sechs als positiv identifizierten Härter

Im Vergleich zu den Mono, Di- und Triglycidylethern sind die Amine strukturell weiter voneinander entfernt. Der Mechanismus der Proteinreaktion ist dementsprechend nicht unbedingt derselbe, deswegen ist die relative Vergleichbarkeit der Ergebnisse weniger gegeben als bei den Glycidylethern (RV). Beispielsweise führt beim EDA der oxidative Metabolismus zunächst zum Glyoxal, welches dann mit den zellulären Proteinen reagieren kann. Bei den längerkettigen Aminen spielen wahrscheinlich auch noch Aldehyde eine Rolle.

Allerdings lassen sich die Unterschiede in den Ergebnissen (positiv versus negativ im KeratinoSens™) bei einigen Stoffen nicht durch die geringen strukturellen Unterschiede erklären (z.B. Dipropylentriamin (positiv, $I_{max} \emptyset 1,67$) und Diethylentriamin (negativ, $I_{max} \emptyset 1,22$)). Für 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan liegt die I_{max} auch im Grenzbereich des Thresholds für einen positiven Test ($I_{max} \emptyset 1,66$).

Nach mündlicher Kommunikation mit einem der Testentwickler (A. Natsch, Givaudan) sind EC2 und EC3 Werte besser zur Wirkstärkenvorhersage innerhalb einer Gruppe. Da aber nicht bei allen bestimmbar (siehe Tabelle 28), wird der Vergleich auf Basis der EC1,5 Werte

durchgeführt. Zumal auch die Ergebnisse anderer oft nur die EC1,5 Werte referieren, da diese regulatorisch von Bedeutung sind.

Im relativen Vergleich (ohne die strukturellen Unterschiede zu berücksichtigen) ergibt sich auf Basis dieses KeratinoSens™ folgende Reihung der positiven Testergebnisse geordnet nach absteigender Reaktivität (und somit sensibilisierenden Wirkstärke). In Klammern sind die jeweils im Projekt vergebenen Wirkstärkekategorien aufgeführt.

IPD (HS) > AEP (U(→HS)) > 1-10 Diamino-4,7-dioxadecan (U (→GMS))
> Dipropylentriamin (U→HS) > N-Cyan-TMD (U) > EDA (HS)

Bis auf das 1-10 Diamino-4,7-dioxadecan (CASRN 2997-01-5) sind alle der positiven Testergebnisse mit Inhaltsstoffen assoziiert, die entweder in die Kategorie HS eingeordnet sind oder zumindest einen Hinweis auf diesen Kategorie enthalten.

Für einige alipathische Aminhärter gibt es in Leung und Auletta (1997) eine relative Reihenfolge gemäß ihrer sensibilisierenden Wirkstärke im GPMT²⁵. Diese entspricht in Richtung abnehmender Wirkstärke der Reihe:

EDA (HS) > DETA (HS) > AEP (U (→ HS)) > TETA (HS) > PEHA (GMS) > TEPA (GMS)

Man sieht zunächst, dass die Reihung die Gesamtbewertung nach Wirkstärke der sechs Inhaltsstoffe stützt. Man sieht zudem im Vergleich zum KeratinoSens™ Ergebnis, dass EDA und AEP in umgekehrter Reihung auftreten. Die im *in vitro* Test negativ getesteten Inhaltsstoffe DETA und TETA werden im GPMT als eher stärker wirksam charakterisiert. Übereinstimmend mit dem negativen Testergebnis aus dem KeratinoSens™ ist, dass TEPA das Schlusslicht im GPMT darstellt. Es bleibt zu bedenken, dass die teils widersprüchlichen Ergebnisse zwischen einer Bewertung im Tierversuch und einer *in vitro* Testung sich nicht gänzlich widersprechen. Jeder *in vitro* Test bildet nur einen der notwendigen Schritte in einer ganzen Kaskade ab, die letztlich zur Auslösung einer Kontaktsensibilisierung führen. Die Beurteilung der sensibilisierenden Eigenschaften eines Inhaltsstoffes, allein auf Basis beispielsweise der Aktivierung von Keratinozyten ist nicht ausreichend. Der Tierversuch prüft indes alle notwendigen Schritte ab, es ist jedoch nicht gesagt, dass das Ergebnis den im Menschen zu erwartenden Effekt gänzlich richtig abbildet.

²⁵ Kurzübersicht der normalisierten Ergebnisse aus dem GPMT von Leung und Auletta, 1997

Substanz (CAS Nr.)	Epikutane Ind. [%].	Auslösedosis [%]	% positiver Tiere	Normalisierte Antwort
EDA (107-15-3)	10	5	45	0,9
DETA (111-40-0)	50	25	80	0,064
AEP (140-31-8)	50	25	25	0,02
TETA (112-24-3)	95	50	74	0,016
PEHA (4067-16-7)	100	100	100	0,01
TEPA (112-57-2)	60	50	5	0,002

Intradernale Induktionsdosis jeweils 5 % in Wasser; Ind.: Induktionsdosis; Normalisierung erfolgt über: Normalisierte Antwort = % Antwort / (epikutane Induktionsdosis)*(Auslösedosis); Maximum liegt bei 2

Die Ergebnisse für die vier im KeratinoSens™ geprüften Reaktivverdünner finden sich in Tabelle 30 zusammengefasst.

Tabelle 30 Ergebnisse für die im KeratinoSens™ überprüften Reaktivverdünner

Substanz	Geo Mean EC1.5 [µM]	Geo Mean EC2 [µM]	Geo Mean EC3 [µM]	IC50 [µM]	Geo Mean I _{max} [µM]
Butyl-GE ²	48,89	90,61	152,71	599,2	59,77
2-Ethylhexyl-GE	28,81	81,84	191,58	255,02	3,93
Phenyl-GE	16,1	28,11	42,92	187,0	60,89
o-Kresyl-GE	15,39	29,85	46,78	151,15	28,75

Die Mehrheit der Reaktivverdünner würde bereits im Vorläuferprojekt im KeratinoSens™ geprüft. Zur Auswertung wurde damals folgendes befolgt: „Der EC1,5 Wert ist laut einem der Testentwickler (A. Natsch, mündliche Kommunikation) bezüglich der Wirkstärkenbewertung informativer als der I_{max} Wert²⁶. Bei Epoxiden scheint der EC3 bzw. EC4,5 Wert eventuell noch geeigneter. Aus diesem Grund wurde der EC4,5 Wert ebenfalls ausgewiesen, allerdings aufgrund von Unsicherheiten die Bewertung auf Basis des EC1,5 Wertes durchgeführt.“

Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass EC2 und EC3 Werte besser zur Wirkstärkenvorhersage innerhalb einer Gruppe sind. Der Phenyl-GE und o-Kresyl-GE sind demnach ähnlich stark wirksam, wohingegen 2-Ethylhexyl-GE ebenso wie BGE weniger stark im KeratinoSens™ reagieren.

EC2 und EC3 Werte wurden, insbesondere bei den im Vorläuferprojekt getesteten Reaktivverdünnern (siehe Tabelle 34), nicht bestimmt und deswegen wird der relative Vergleich aller Reaktivverdünner auf Basis der EC1,5 Werte durchgeführt (siehe Kapitel 7.1.12). Zumal auch die Ergebnisse anderer oft nur die EC1,5 Werte referieren, da diese regulatorisch von Bedeutung sind.

5.2.3 LLNA (reduzierter Test)

- Allgemeine Beobachtungen und Reizwirkung:

Während der Studie wurde keine Mortalität oder Anzeichen von systemischer Toxizität beobachtet. Im Zusammenhang mit der Behandlung wurde bei den untersuchten Tieren auch kein Gewichtsverlust beobachtet. Bei der Testung von Dipropylentriamin (Bis (3-aminopropyl)amin; CASRN: 56-18-8; Testmaterial B) wurde zu unterschiedlichen Zeiten und bei beiden getesteten Konzentrationen in einigen Tieren Alopecia festgestellt (10% (w/v): ein Tier an den Tagen 3-6 und zwei Tiere an den Tagen 5-6 beobachtet; 2% (w/v): zwei Tiere an

²⁶ Die I_{max} ist stark von der Toxizität der untersuchten Substanz abhängig (siehe IC50, Konzentration bei der noch 50% der Zellen leben). Substanzen mit einer geringen Toxizität haben eine breite Konzentrations-Wirkungsbeziehung (bezogen auf die Luziferaseinduktion), die I_{max} kann dann sehr hohe Werte annehmen. Ist eine Substanz allerdings bereits in niedrigen Konzentrationen toxisch (siehe z.B. der C12/C14-GE → kleiner IC50 Wert), werden die Zellen bald abgetötet und ein Anstieg des I_{max} Wertes somit verhindert.

den Tagen 5-6). Außerdem wurden in der 10 % (w/v) Gruppe mit diesem Testmaterial leicht steife Ohren festgestellt, bei allen Tieren an Tag 4 und bei einem Tier an den Tag 5-6. Bei Isophorondiamin (CASRN: 2855-13-2; Testmaterial D) wurde in der 10% (w/v) Dosisgruppe bei allen Tieren kleinere Wunde an den Tagen 4-6 beobachtet, sowie leicht steife Ohren an den Tagen 5-6 verzeichnet. Für keines der Testmaterialien wurden bei der visuellen Untersuchung Hinweise auf eine Reizung am Ort der Anwendung gefunden. Die Messung der Ohrdicke zeigte jedoch eine lokale Reizwirkung bei drei Tieren in der 10% (w/v) Dosisgruppe von Dipropylentriamin (Testmaterial B) am Tag 6 und für alle Tiere in der 10% (w/v) Gruppe von Isophorondiamin (Testmaterial D) ebenfalls am 6. Tag.

- Sensibilisierung

In Tabelle 31 finden sich jeweils die Aussage, ob eine lokale Reizwirkung zu beobachten war, die gemessenen Stimulationsindizes pro Dosisgruppe und die daraus errechneten EC3 Werte.

Tabelle 31 Ergebnis des Lokalen Lymphknoten Tests mit zwei fixierten Dosisgruppen

Testgruppe	Konz. (% w/v)	Lokale Reizwirkung	Gruppen Stimulationsindex	EC3 Wert (% w/v)	EC3 Wert (mM)
Negativkontrolle (Vehikel; AOO)	--	-	1.0	--	--
Testmaterial A o-Kreslyglycidylether (CAS 2210-79-9)	10	-	16.1	1.6	97.4
	2	-	4.7		
Testmaterial B Bis(3-aminopropyl)amin (CAS 56-18-8)	10	+/-	4.3	3.9	297.2
	2	-	2.6		
Testmaterial C ipox EH 2240 (CAS 90530-16-8)	10	-	1.2	--	--
	2	-	0.5		
Testmaterial D Isophorondiamin (IPD, CAS 2855-13-2)	10	+	7.9	4.1	240.8
	2	-	1.3		
Testmaterial E IPD-POLYMER DBC-15-01 (38294-64-3)	10	-	1.6	--	--
	2	-	0.8		
Positivkontrolle (25% (w/v) HCA in AOO)	--	+/-	5.3	--	--

Anmerkung: Spalte lokalen Reizwirkung: - bedeutet keine Anzeichen einer lokalen Reizung, +/- bedeutet, dass eine übermäßige lokale Reizung für mindestens eins (aber nicht alle) Tiere in der Gruppe gefunden wurde; + bedeutet, dass eine übermäßige lokale Reizung für alle Tiere in der Gruppe beobachtet wurde.

Das Ergebnis der positiven Kontrollsubstanz α -Hexylzimtaldehyd (HCA, gelöst im selben Vehikel), zeigt die entsprechende Leistung des Assays zu zeigen. Für HCA wurde eine signifikante lymphoproliferative Antwort (Stimulationsindexwert von 5,3) festgestellt. Die Gültigkeit der Testergebnisse ist somit bestätigt.

In der Abbildung 12, die dem Originalbericht entnommen wurde, finden sich die Stimulationsindices der Testmaterialien nochmals graphisch dargestellt.

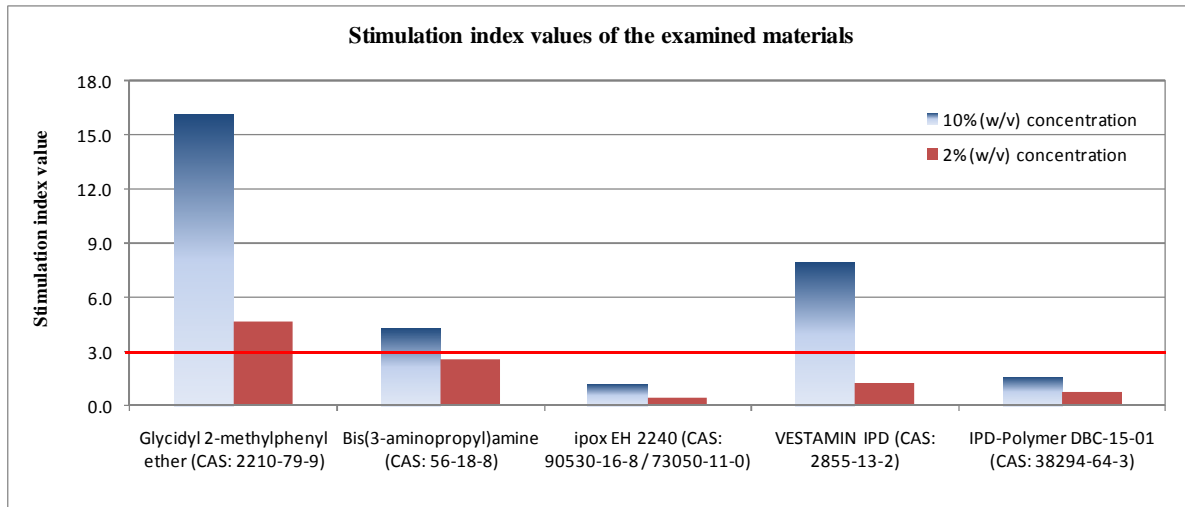


Abbildung 12 Stimulationsindices aus dem LLNA

Wie aus Tabelle 31 und Abbildung 12 zu entnehmen wird bei zwei Testmaterialien der Schwellenwert einer 3fachen Stimulation über der Negativkontrolle unter den gegebenen Testkonzentrationen nicht erreicht – dies sind die Testmaterialien C (ipox EH 2240; m-Xylylendiamin/Acrylonitril Adduct; CASRN 90530-16-8 / 73050-11-0) und E (IPD - POLYMER DBC - 15-01; oligomerisierter Härter, CASRN 38294-64-3). Innerhalb dieser Studie wurde demnach kein Hautsensibilisierungspotential für diese Materialien gefunden. Allerdings wäre in einem Standardtest die Testkonzentration bis hin zu einer Testkonzentration mit maximal leicht reizender Wirkung zu erhöhen gewesen (vgl. OECD TG 429). Der Bereich wurde in diesem reduzierten Test nicht abgeprüft, sodass eine Aussage über das Sensibilisierungspotential und über die Wirkstärke (im Sinne des wahren EC3 Wertes) nicht treffen lässt. Mit Sicherheit lässt sich allerdings sagen, dass ein EC3 Wert bei > 10% (w/v) liegen würde und somit eine Einordnung zumindest in die Gruppe GMS zur Folge hätte.

Für die Testmaterialien A, B und D konnte anhand der im Testbericht gegebenen Formeln jeweils der EC3 Wert berechnet werden, da mindestens eine der Testkonzentrationen einen Stimulationsindex von < 3 aufwies.

Bei Isophorondiamin (Testmaterial D) wurde in der Hochdosisgruppe in allen Tieren eine lokale Reizwirkung verzeichnet. Dadurch kann es bei der Berechnung des EC3 Wertes zu einer Überschätzung der sensibilisierenden Wirkstärke kommen. Nach Abschluss der Testphase wurde mit dem durchführenden Labor diskutiert, ob noch eine weitere Testgruppe (5 % (w/v)) in Betracht gezogen werden soll, um die Berechnung des EC3 Wertes zu verbessern. Dies wurde aus tierschutzrechtlichen Gründen abgelehnt, da es der verbesserte EC3 Wert im Bereich zwischen 4 und 10% liegen würde und so im vorliegenden Ranking zu keiner Änderung der Einschätzung führen würde.

Unter den Bedingungen der vorliegenden Ranking-Studie mit festgelegten Dosierungen wurde die sensibilisierende Wirkstärke der Testmaterialien wie folgt bewertet:

o-Kreslyglycidylether (CASRN: 2210-79-9) > Bis (3-aminopropyl) amin (CASRN: 56-18-8) ≈ Isophorondiamin (IPD, CASRN: 2855-13-2) >> ipox EH 2240 (CASRN: 90530-16-8 / 73050-11-0) und IPD-POLYMER DBC-15-01 (CASRN: 38294-64-3)

Die erzielten Ergebnisse stimmen gut mit der bestehenden Einordnung für zwei Inhaltsstoffe überein (o-Kresyl-GE, IPD). In Zusammenhang mit *in vitro* Ergebnissen ist für die drei anderen Inhaltsstoffe eine Tendenzbewertung möglich (Dipropylentriamin, ipox EH 2240, IPD-POLYMER DBC-15-01).

5.2.4 Fazit und Diskussion

Im Projekt FP-0384 wurden insgesamt

- 5 Messungen im reduziertem LLNA (weniger Testkonzentrationen als Standardtest),
- 10 Messungen im DPRA und
- 20 Messungen im KeratinoSens™

durchgeführt.

Diese projektspezifische Testung führt zur Verbesserung der Datenlage bei vielen Inhaltsstoffen. Wie bereits eingangs mehrfach erwähnt ist bei der Bewertung eines Stoffes anhand von *in vitro* Daten. Ein Testergebnis allein nicht ausreichend, es sollten verschiedenen mechanistische Schlüsselereignisse abgeprüft werden, um eine Aussage über die sensibilisierenden Wirkung einer Substanz machen zu können. In diesem Sinne wurde die Vollständigkeit der *in vitro* Testbatterie für alle Inhaltsstoffe überprüft und in Abbildung 13 findet sich eine vergleichende Bewertung aus dem Vorläuferprojekt FP-0324 mit dem Stand nach dem aktuellen Projekt.

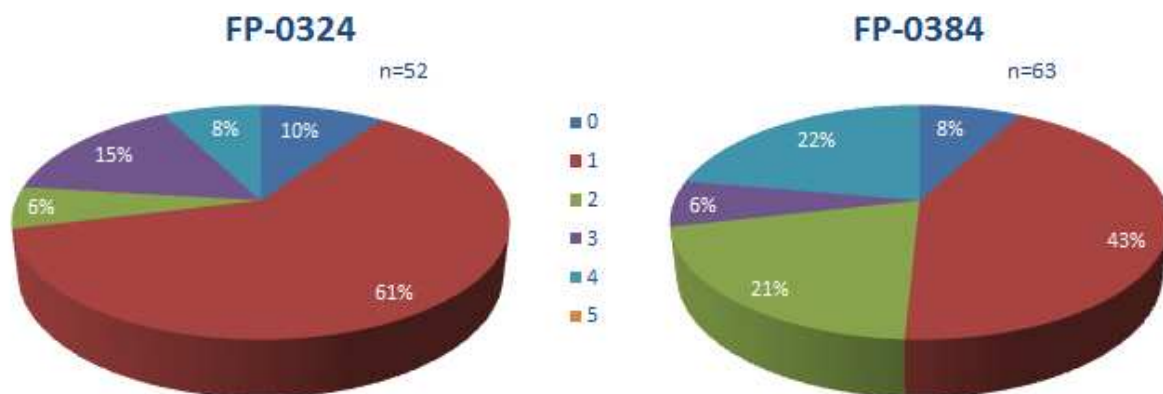


Abbildung 13 Vollständigkeit der *in vitro* Testbatterie

Maximal fünf mechanistische Schlüsselereignisse können abgeprüft werden. Das Vorhandensein von zwei oder mehr Tests stellt dabei schon eine gute Ausgangsbasis dar.

Anmerkung: n = 63 anstelle von sonst n = 66 in FP-0384, spiegelt die Tatsache wider das mehrere Substanzen zusammengefasst bewertet wurden (z.B. nur 2 Einträge für BisphenolA bzw. F- Harze anstelle der insgesamt 5 CASRN Einträge in der Inhaltsstoffliste

Die deutliche Verbesserung der Datenlage ist der Graphik zu entnehmen. Für circa die Hälfte der Inhaltsstoffe liegen Ergebnisse für mindestens zwei, drei oder sogar vier Schlüsselereignisse vor. Für 27 Stoffe (43 %) liegt nur ein *in vitro* Testergebnis vor und für 5 Stoffe konnte gar keine *in vitro* Bewertung gefunden werden (dies sind die Stoffe, denen eine eindeutige Struktur fehlt, diese wird für die Bewertung der Bioverfügbarkeit benötigt).

Für das mechanistische Verständnis der sensibilisierenden Wirkung und für die Wirkstärkenbewertung hat dies insgesamt viel bewirkt. In Zusammenschau der Ergebnisse aus dem reduzierten LLNA und den *in vitro* Ergebnissen ist beispielsweise für drei Inhaltsstoffe eine Tendenzbewertung möglich (Dipropylentriamin, ipox EH 2240, IPD-POLYMER DBC-15-01). Und auch bei anderen Inhaltsstoffen führen die Hinweise aus den *in vitro* Tests zu einer verbesserten Bewertung (siehe substanzspezifische Bewertungen in Kapitel 7). Allerdings ist weiterhin anzumerken, dass immer noch eindeutige cut-off Werte für die quantitative Wirkstärkenbewertung fehlen. Verschiedene Ansätze werden aktuell wissenschaftlich diskutiert. Ein Ansatz der beispielsweise vielversprechend ist, um eine quantitative Auswertung im DPRA zu ermöglichen ist die über verschiedene Zeiten und Konzentrationen ermittelten Verläufe der Reaktion (persönliche Kommunikation B. Wareing, Publikation in Vorbereitung).

Insgesamt wird aus der Literaturanalyse und der Anwendung in diesem Projekt deutlich, dass keines der Systeme perfekt ist, dies bezieht sich auf jeglichen Ansatz (*in vivo*, *in vitro* und *in silico* Analysen). Ergebnisse aus verschiedenen *in vitro* und *in silico* Ansätzen sind komplementär und sollten nicht isoliert betrachtet werden. Vor allem bei Verwendung der neuen *in vitro* und *in silico* Ansätze ist demnach ein hohes Maß an Expertenwissen für eine korrekte Bewertung gefragt. Eine erste Studie zeigt auf, dass die neuen Methoden „Bekanntes“ besser vorhersagen, als noch ungeprüfte Chemikalien. Im Beispiel wurden 32 „unbekannte Chemikalien“. Diese Schwierigkeiten konnten durch Probleme mit der Löslichkeit, der Vehikelauswahl, Probleme bei der Auswertung im DPRA wegen Co-Elution bei der Analyse, Autofluoreszenz der zu prüfenden Stoffe, die mit der durchflusszytometrischen Analytik interferiert und/oder widersprüchliche Tierdaten die zu Grunde lagen erklärt werden (Basketter et al., 2015). Auch im vorliegenden Projekt traten bei der Testung verschiedener Inhaltsstoffe Probleme auf (z.B. starke zytotoxische Effekte oder Präzipitation im Versuchsansatz), diese wurden möglichst transparent berichtet und die daraus entstehenden Unsicherheiten in die stoff- bzw. gruppenspezifischen Bewertungen miteinbezogen.

6 ARBEITSSCHRITT 6: ZUSÄTZLICHE *IN SILICO* ANALYSE

Die Autoren um Joanna Jaworska von Procter & Gamble konstruierten ein Bayes'sches Netz aus einem Set von *in vitro*, *in silico* und *in chemico* Daten, um die Wahrscheinlichkeitsverteilung aller beteiligten Variablen zu berücksichtigen (2013; 2011; 2015). Die daraus resultierende Kategorisierung entspricht dabei - nicht sensibilisierend, schwache, mittlere und hohe Wirkstärke - gemäß der Kategorisierung von LLNA Daten (ECETOC, 2003). In Zusammenarbeit mit den Autoren der ITS wurde versucht für möglichst viele Inhaltsstoffe von Epoxidharzgemischen eine Vorhersage gemäß der bereits im Methodenteil vorgestellten ITS-3 zu generieren. Dazu wurden von FoBiG eine Substanzliste zur Verfügung gestellt, die den Namen, die CAS-Nummern, den SMILES und falls vorhanden Ergebnisse aus *in vitro* Tests enthielten (DPRA, KeratinoSens™ und h-CLAT; siehe Anhang 6 – Eingangsdaten für die ITS-3 Modellierung). Von den ITS-Entwicklern wurden dann mit Hilfe einer kostenpflichtigen Software einige physikalisch chemische Parameter vorhergesagt, um die Bioverfügbarkeit einer Substanz abzuschätzen (ACD Labs; Verteilungskoeffizient bei pH7 (logD@pH7), Wasserlöslichkeit bei pH7 (Ws@pH7), Bestimmung der ionisiert vorliegenden Fraktion bei pH7 (fion), % Substanz, welche an Plasmaproteine gebunden vorliegen). Außerdem wurde in TIMES-SS eine Wirkstärkenvorhersage durchgeführt (Kat 1 = nicht, Kat 2 = schwach, Kat 3 = stark sensibilisierend). Ebenfalls mit einbezogen wurden (falls vorhanden) quantitative Messwerte des DPRA, KeratinoSens™ und h-CLAT.

6.1.1 Ergebnisse

Insgesamt wurden 51 Substanzen bewertet, dies sind fünf weniger als von FoBiG zur Verfügung gestellt wurden. Die entsprechenden Substanzen (CASRN 25068-38-6, 25085-99-8, 9003-36-5, 26447-14-3, 90529-77-4) entfielen entweder auf Grund von nicht eindeutigen SMILES oder Anwendungsbeschränkungen der Modellierungssysteme. Ein genereller Nachteil bei vielen IST/STS/IATA Ansätzen, die auch *in silico* Vorhersagen miteinbeziehen ist demnach, dass nur Aussagen erfolgen, wenn einer Substanz eine definierte Struktur zuzuweisen ist. Ist dies nicht der Fall, z.B. bei Gemischen, so kann keine Aussage getroffen werden.

Zieht man die Einordnung der 51 Substanzen in die von den Entwicklern angewandten Wirkstärkekategorien nach ECETOC heran (LLNA, EC3 < 1 % stark, 1-10 % moderat, 10-100 % schwach, nicht sensibilisierend; Kimber et al., 2003) so ergibt sich die in Tabelle 32 gezeigte Verteilung gemäß den pEC3 Kategorien bzw. den Bayes Faktoren.

Tabelle 32 Zusammenfassung der Ergebnisse

Grundlage	Nicht sensibilisierend (EC3 > 100 %)	Schwach (EC3 ≥ 10 - < 100 %)	Moderat (EC3 ≥ 1 - < 10 %)	Stark (EC3 < 1 %)
pEC3 Kategorie	6	9	27	9
Bayes Faktor Kategorie	6	9	20	16
EC3 errechnet	5	11	29	6

Für eine Einordnung gemäß der im vorliegenden Projekt angewandten Methodik ist allerdings eine Umrechnung in einen EC3 Wert wie er aus dem LLNA resultieren würde notwendig.

Dies wurde von FoBiG für alle Substanzen durchgeführt gemäß der von den Entwicklern vorgezeigten Methodik (Ergebnis siehe Anhang 7 – Übersicht der Ergebnisse aus ITS-3 Modellierung). Insgesamt ergibt sich für 5 Substanzen ein EC3 Wert von > 100 % und für 11 Substanzen ein EC3 Wert > 10 %, im vorliegenden Projekt kann dies als Hinweis in Richtung der Kategorie mit geringer bis mittlerer Wirkstärke eingeordnet (Kategorie GMS). Wie im Bericht unter 1.3.2 beschrieben liefern die Bayes Faktoren (BF) zudem noch eine Aussage mit welcher Sicherheit eine Substanz in die vorhergesagte Wirkstärkekategorie richtig eingeordnet ist. Im vorliegenden Projekt wird diese Information ebenfalls miteinbezogen.

Bei den bewerteten Stoffen wird die Stärke der Kategoriezuordnung nach BF nur in 4 Fällen als besonders stark eingeordnet (BF > 30), dies betrifft drei der Substanzen, die als nicht sensibilisierend eingeordnet wurden und eine Substanz mit schwacher Sensibilisierungswirkung. Weitere 4 Substanzen haben einen BF zwischen 10-30 (Zusammenfassung siehe Tabelle 33). Für 20 der Substanzen ist der maßgebliche Hinweis für die Zuordnung zur Wirkstärkekategorie zumindest als „substantiell“ gekennzeichnet, jedoch bei 23 Stoffen wird der maßgebliche Hinweis nur als sehr schwach bezeichnet, d.h. eine andere Wirkstärkekategorie käme durchaus in Betracht. Dementsprechend werden die Hinweise auf bestimmte Wirkstärkekategorien nur in acht Fällen (BF mindestens 10) als deutlicher Hinweis gewertet – in den restlichen Fällen geht die Zuordnung in die Gesamtbewertung der Substanz ein, bei widersprüchlichen Ergebnissen wird der Zuordnung der Wirkstärke nach ITS-3 jedoch kein besonderes Gewicht zugemessen.

Tabelle 33 Stoffe, bei denen die Vorhersage der Wirkstärkekategorie als starker Hinweis gilt (BF mindestens 10)

CASRN	pEC3 category.1	pEC3 category.2	pEC3 category.3	pEC3 category.4	EC3 % berechnet	BF
107-15-3	0,00287245	0,11992589	0,87570669	0,00149494	1,6	10-30
694-83-7	0,97852323	0,01908011	0,00118158	0,00121506	101	>30
1477-55-0	0,97852323	0,01908011	0,00118158	0,00121506	101	>30
2997-01-5	0,05575549	0,91702142	0,02145532	0,00576776	25,6	>30
85-44-9	0,07475508	0,07501768	0,79141238	0,05881484	3,9	10-30
98-54-4	0,9103764	0,04857970	0,00297639	0,03806750	101	10-30
80-05-7	0,91037642	0,04858020	0,00297638	0,03806698	101	10-30
98-94-2	0,97849946	0,01907634	0,00118244	0,00124174	101	>30

Die Wahrscheinlichkeit, welche die sensibilisierende Wirkstärkekategorie bestimmt

Die Relevanz der Einordnung für die acht Stoffe wird jeweils im substanzspezifischen Teil in Kapitel 7.1 genauer erörtert. Hier sei erwähnt, dass bei gut untersuchten Stoffen für die viele Tierexperimentelle Daten vorhanden sind, ggfs. *in vitro* Daten fehlen (Bsp. 1477-55-0). Somit fehlen auch viele Eingangsparameter für die Vorhersage im Bayes-Netzwerk. Die Vorhersage

ist dann stark von der Vorhersage des Expertensystems TIMES (siehe FP-0324, Teilprojekt 5.1, Abschnitt 1.4.5 TIMES-SS) abhängig. Da die Plattform TIMES nicht frei verfügbar ist können die Hintergründe nicht weiter überprüft werden und eine Aussage zur Qualität nicht getroffen werden. Positiv zu verbuchen, ist die auf der *in silico* Vorhersage beruhende Neubewertung des 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan (CASRN 2997-01-5).

Für 23 Stoffe liegt ein experimenteller EC3 Wert vor. Für 7 Stoffe liegt der errechnete EC3 Wert niedriger als der experimentell ermittelte (maximal Faktor 5). Für weitere 10 Stoffe liegt der Wert maximal um den Faktor 5 höher als der experimentell ermittelte EC3 Wert. Es könnte somit eine leichte Unterschätzung der sensibilisierenden Wirkstärke vorliegen. Bedenkt man jedoch die bereits im Methodenteil diskutierte Variabilität der Ergebnisse im LLNA so relativiert sich die Sorge einer möglichen Unterschätzung der sensibilisierenden Wirkstärke in diesen Fällen. Bei den restlichen 6 Substanzen liegt allerdings eine über die Variabilität hinausgehende Unsicherheit vor. Aus diesem Grund wurden die jeweiligen Ergebnisse im Detail verglichen und substanzspezifisch diskutiert. Die sechs Stoffe sind:

- Trimethylhexamethylendiamin (TMD; CASRN 25620-58-0)
- 1,2-Diaminocyclohexan (DCH; CASRN 694-83-7)
- m-Xylidendiamin (MXDA; CASRN 1477-55-0)
- N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan (CASRN 1760-24-3)
- C12/C14-Monoglycidylether (CASRN 68609-97-2)
- Phthalsäureanhydrid (CASRN 85-44-9)

Allerdings ist anzumerken, dass nur in zwei Fällen ein starker Hinweis vorliegt (bei 694-83-7 und 1477-55-0).

Vergleicht man die im Projekt erzielte Wirkstärkenzuordnung mit der Vorhersage aus der ITS-3 findet man, dass:

- für 31 Stoffe (> 60 %) die Vorhersagen aus ITS-3 und unser Ranking gemäß der Methodik in beiden Projekten übereinstimmt.
- Bei 9 Stoffe kommt es zu widersprüchliche Ergebnisse (nur in zwei Fällen starker Hinweis all (CASRN 694-83-7 und 1477-55-0).
- Und für 11 Stoffe, die bisher in die Kategorie U fallen, gibt es nun zumindest erste Hinweise auf eine Kategoriezuordnung, allerdings ist diese nur in einem Fall mit einem starken Hinweis (hoher BF) assoziiert.

Die Bewertung eines Inhaltsstoffes innerhalb der ITS-3 ist ein iterativer Prozess und die Vorhersagen könnten sich bei mehr oder besseren Daten ebenfalls verbessern. Probleme die die Qualität von *in vitro* Tests beeinflussen, wie z.B. Löslichkeit der untersuchten Substanzen, Vehikelwahl, Probleme bei der Analytik (Basketter et al., 2015), beeinflussen letztlich auch die Qualität der ITS/IATA, die diese Testergebnisse wiederum als Eingangsparameter nutzt.

Allgemein zeigen verschiedene computergestützte, integrierte Ansätze zur Bewertung großes Potential die sensibilisierenden Eigenschaften, sowie die Potenz eines Stoffes richtig einzuschätzen ohne dabei neue Tierversuche nötig zu machen (Strickland et al., 2016a; Strickland et al., 2016b). Unsere Auswertung der ITS nach Jaworska zeigt diese Tendenz ebenfalls. Allerdings ist die Interpretation der gesammelten *in vitro* Ergebnisse wesentlich komplexer als die „einfache“ Aussage eines LLNA zu bewerten. Nicht zu vergessen bleibt, dass auch der LLNA mit den bekannten Nachteilen behaftet ist (*in vivo* Methode (bildet ebenfalls nur Vorstufen des adversen Effekts ab), Variabilität, potentiell falsch Positive bei

hohen Testkonzentrationen (20–100 %) und auch falsch Negative). Die regulatorischen Anforderungen machen es allerdings nötig zu dieser komplexeren Auswertungsstrategie überzugehen (Natsch und Emter, 2015).

7 ARBEITSSCHRITT 7: AKTUALISIERTES RANKING (GESAMTSTOFFLISTE)

Das prinzipielle Vorgehen der Bewertung im vorliegenden Bericht im Sinne einer „Weight of evidence“ (WoE) Betrachtung findet sich – wird wie bereits in Kapitel 1.1 besprochen – auch in anderen Bewertungsansätzen der sensibilisierenden Eigenschaften (z.B. OECD, 2012b, Anhang 1 (qualitativ))²⁷.

Das im Vorgängerprojekt eingeführte Ampelsystem zur späteren Bewertung der spezifischen Datenlage wird auch in diesem Projekt fortgeführt. Die Farbgebung entspricht dabei den folgenden Vergabekriterien:

- rot – keine/ kaum Daten verfügbar,
- orange – „Unvollständiger“ Datensatz → eine quantitative Bewertung ist erst durchzuführen, wenn weitere Testergebnisse vorliegen,
- grün – „Vollständiger“ Datensatz → es wird erwartet, dass eine quantitative Analyse der Wirkstärke durchführbar ist.

7.1 Einzelstoffbewertung

7.1.1 Epoxidharze

7.1.1.1 Bisphenol A-Harze, CASRN 25068-38-6

→ ausreichend Tierdaten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Nein (evtl. relativ)
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (evtl. relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Nein (evtl. relativ)
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	Ja	Ja (schwach)

Wie bereits im Vorgängerprojekt besprochen sind die Monomere und Oligomere (mit einem Molekulargewicht von < 900 Da) von DGEBA die häufigsten und wichtigsten Verursacher der Kontaktallergie bei Epoxidharzsystemen. Neue experimentelle *in vivo* Daten (LLNA) stützen die Zuordnung in Kategorie HS und weisen sogar in Richtung der Kategorie SHS (formale SHS Prüfung). Die Datenlage im Bereich der *in vitro* Testbatterie spiegelt deutlich die Entwicklung der letzten Jahre wieder – mittlerweile liegen für vier der fünf Schritte Daten vor. Allerdings

²⁷ Guidance on information requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R.7a: Endpoint specific guidance, Draft version 5.0, June 2016; Full revision Section R.7.3 Skin and Respiratory sensitisation. <http://echa.europa.eu/support/guidance/consultation-procedure/ongoing-reach>

kann anhand der Daten keine eindeutige Wirkstärkenkategorisierung durchgeführt werden, da immer noch valide cut-off Werte fehlen. Ein relativer Vergleich von DGEBA (CASRN 1675-54-3) mit den, nach demselben Reaktivitätsmechanismus (S_N2 -Mechanismus) reagierenden, Reaktivverdünnern Butylglycidylether (BGE, CASRN 2426-08-6) und Phenylglycidylether (PGE, CASRN 122-60-1) lohnt jedoch. Man findet im DPRA das DGEBA sehr stark mit Cystein, jedoch nicht so stark mit Lysin reagiert wie die Reaktivverdünner. Im KeratinoSens™ liegt der EC1,5 von DGEBA um ein vielfaches unter den EC1,5 Werten der Reaktivverdünnern (d.h. Keratinozytenreaktion bei BGE und PGE weniger stark ausgeprägt). Während das DGEBA im h-CLAT ein deutlich positives Ergebnis zeigt, erhält man für die Reaktivverdünner jeweils negative Ergebnisse. Und der MUSST Assay liefert eine 10fach niedrigere Effektkonzentration für DGEBA im Vergleich zum BGE (spricht für eine stärkere Aktivierung der dendritischen Zellen durch DGEBA).

Fazit: Die bereits bestehende Zuordnung in die Kategorie HS wird beibehalten. Anhand der Ergebnisse aus den Lokalen Lymphknotentests bei Mäusen ergibt sich eine Tendenz zu Kategorie SHS.

Anmerkung: immunologische Kreuzreaktion zu Bisphenol F-Harzen und Phenylglycidylether

7.1.1.2 Reaktionsprodukt Bisphenol A Epichlorhydrin, CASRN 25085-99-8

siehe unter der CASRN 25068-38-6

7.1.1.3 Bisphenol-A-Epichlorhydrin MW 340, Bisphenol A-Diglycidylether, CASRN 1675-54-3

siehe unter der CASRN 25068-38-6

7.1.1.4 Bisphenol F-Harze, CASRN 9003-36-5

→ ausreichend Tierdaten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Nein
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (evtl. relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S_N2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Wie bereits im Vorgängerprojekt besprochen sind auch die Monomere und Oligomere von DGEBA häufige Verursacher der Kontaktallergie bei Epoxidharzsystemen (häufig Ko-Exposition mit DGEBA-Harzen). Das Ergebnis eines neuen Lymphknotentests (*in vivo*, LLNA) stützt die Zuordnung in Kategorie HS und weist sogar in Richtung der Kategorie SHS (formale SHS Prüfung). Auch die Datenlage im Bereich der *in vitro* Testbatterie hat sich verbessert – es

liegen für drei der fünf Schritte Daten vor. Allerdings kann anhand der Daten keine eindeutige Wirkstärkenkategorisierung durchgeführt werden, da valide cut-off Werte fehlen. Wie bereits beim DGEBA kann auch für DGEBF ein relativer Vergleich angestellt werden auf Basis der erzielten *in vitro* Ergebnisse. DGEBF und DGEBA erzielen ähnliche Ergebnisse im DPRA und im KeratinoSens™. Dementsprechend ruft auch DGEBF eine deutlich stärkere Keratinozytenreaktion hervor als die mechanistisch vergleichbaren Reaktivverdünner BGE und PGE.

Fazit: Die bereits bestehende Zuordnung in die Kategorie HS wird beibehalten. Anhand der Ergebnisse aus dem LLNA ergibt sich eine Tendenz zu Kategorie SHS.

Anmerkung: immunologische Kreuzreaktion zu Bisphenol A-Harzen und Phenylglycidylether

7.1.1.5 Bisphenol-F-Epichlorhydrin, CASRN 28064-14-4

siehe unter der CASRN 9003-36-5

7.1.1.6 Epoxidharzmonomere (chemisch modifiziert)

→ nur 1 <i>in vivo</i> Test/Inhaltsstoff → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja (teilweise)	Nein
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Als Ausgangsprodukte der chemisch modifizierten Epoxidharzmonomere dienen Bisphenol A- und Bisphenol F-Diglycidylether (siehe 3.3.8).

Diese wurden folgendermaßen modifiziert:

- durch Einführung nichtaromatischer Ringe
- durch Verlängerung der 2,3-Epoxypropoxyseitenketten zu 3,4-Epoxybutoxygruppen
- durch Verkürzung der 2,3-Epoxypropoxyseitenketten zu 2,3-Epoxypropylgruppen

Bei der Untersuchung im LLNA zeigte sich, dass die modifizierten Diglycidylether im LLNA einen EC3 Wert aufweisen, der maximal um den Faktor 2,3 höher liegt als bei der Muttersubstanz, entsprechend einer geringeren Wirkstärke der Sensibilisierung. Allerdings befinden sich alle EC3 Werte im Bereich der Kategorie HS. Anhand der unter Schritt C ermittelten log K_{O/W} und log K_P Werte wird von einer guten Bioverfügbarkeit ausgegangen. In einem DPRA, der nicht unter Standardbedingungen durchgeführt wurde, zeigten sich deutliche Unterschiede für die Peptidreaktivität der DGEBF-Derivate (DGEBA-Derivate nicht getestet). Während die Muttersubstanz (DGEBF) zu einer Peptiddepletion von über 90 % führte, war die Peptidreaktivität der Derivate verringert (nur 16 bis 32 % Depletion). Eine Wirkstärken-

kategorisierung kann allerdings nicht durchgeführt werden, da der Test nicht nach Standardvorgehen durchgeführt wurde und valide cut-off Werte fehlen.

Fazit: Auf Basis der nur wenigen Daten würde sich eine Zuordnung in die Kategorie U ergeben (formal hohe Wirkstärkekategorie). Anhand der vorhandenen Vergleichsdaten aus dem LLNA und dem Peptidreaktivitätstest (DPRA, teilweise), sowie unter der Annahme der guten Bioverfügbarkeit, wird eine Übertragung der Wirkstärkekategorie ausgehend von den Muttersubstanzen (DGEBA und DGEBF) als ausreichend erachtet. Eine Zuordnung in die Kategorie HS erfolgt, die Tendenz für SHS entfällt.

7.1.2 Harze: Zusammenfassung und relative Bewertung

Wie bereits im Vorgängerprojekt wurden auch hier verschiedene Harze gemeinsam bewertet. Letztlich finden sich jeweils eine Bewertung für DGEBA- bzw. DGEBF-Harze (jeweils Monomere und Oligomere), sowie eine Bewertung der chemisch modifizierten Epoxidharze.

Die Zuordnung der DGEBA- und DGEBF-Harze zur Kategorie HS bleibt bestehen. Auf Basis der Ergebnisse aus zusätzlichen LLNA Testungen ergibt sich der mögliche Hinweis auf die Kategorie SHS. Die von den Harzen ausgehenden Gefahren sind genügend gut untersucht und es werden keine weiteren Prüfungen vorgeschlagen. Die Unterschiede der sensibilisierenden Wirkstärke zwischen den DGEBA/DGEBF-Harzen und den chemisch modifizierten Harzen sind zu gering, um sich innerhalb der groben Wirkstärkeneinschätzung nach dem Vorliegenden Ranking-Konzept niederzuschlagen. Falls technisch möglich, sollte jedoch weiterhin versucht werden solche weniger sensibilisierenden Harze zu verwenden, um die gesamte sensibilisierende Wirkstärke eines Epoxidharzsystems zu verringern. Weitere Untersuchungen scheinen sinnvoll, sind aber im Projekt nicht vorgesehen.

Anmerkung: immunologische Kreuzreaktion zwischen den DGEBF-Harzen und den genannten DGEBA-Harzen, sowie Phenylglycidylether sind belegt

7.1.3 Härter, aromatische Amine

7.1.3.1 4,4'-Diaminodiphenylmethan, CASRN 101-77-9

→ nur 2 <i>in vivo</i> Tests → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 2 Tests)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
5. T-Zellreaktion	–	–	
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	Metabolit	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Für die als kanzerogen einzustufende Substanz wurden keine neueren Daten bezüglich Hautsensibilisierung gefunden.

Fazit: Die bereits bestehende Zuordnung in die Kategorie GMS bleibt bestehen.

Anmerkung: Trotz der eventuellen Unsicherheit der Zuordnung aufgrund nur weniger vorhandener Daten wird von einer Empfehlung für weitere Tests für die Substanz abgesehen. Wie bereits im Vorgängerprojekt angenommen, befindet sich die Substanz auf Basis Ihrer kanzerogenen Wirkung auf der Liste der „substances of very high concern“ (SVHC, Anhang XIV, Verzeichnis der zulassungspflichtigen Stoffe, gemäß der europäischen Chemikaliengesetzgebung). Aus diesem Grund, findet die Substanz im Epoxidharzbereich keine Verwendung mehr.

7.1.4 Härter, aliphatische Amine

7.1.4.1 Ethylendiamin (EDA), CASRN 107-15-3

→ ausreichend Tierdaten → mehrere <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Nein
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Ja (ARE)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Nein
5. T-Zellreaktion	–	–	
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Durch die verfügbaren Humandaten (Arbeitsschritt 4) erfolgt keine Änderungen der Bewertung der Humandaten. Es liegen keine neuen Tierdaten vor. Jedoch wurde mittlerweile eine Vielzahl an *in vitro* Tests mit EDA durchgeführt.

Verschiedene Tests erzielten dabei negative Ergebnisse (2 x DPRA, 2 x LuSens). EDA ist ein Pro-Hapten (d.h. eine metabolische Aktivierung ist nötig für die Proteinreaktivität). Im *in chemico* Testsystem des DPRA gibt es keine metabolische Aktivierung und in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT ist unter Umständen die metabolische Kapazität zu gering für eine Aktivierung.

Die Aktivierung der Keratinozyten wurde unter anderem in einem ARE-Test und mehreren KeratinoSens™ geprüft. Im ARE-Test liefert EDA ein Ergebnis das in Richtung GMS weist. Für den KeratinoSens™, sowie die weiteren vorliegenden *in vitro* Tests, die die Reifung dendritischer Zellen (h-CLAT, MUSST) oder die T-Zellstimulation (human skin explant test) überprüfen, kann keine quantitative Auswertung erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen. EDA war Teil der Reihentestung im KeratinoSens™. EDA liefert als einer von sechs der insgesamt 16 geprüften Härtern ein positives Ergebnis. Ein relativer Vergleich scheint mechanistisch nur mit sehr eng verwandten Aminen sinnvoll, d.h. aliphatischen Aminen. Außer Dipropylentriamin (CASRN 56-18-8) zeigte kein weiteres aliphatisches Amin ein positives Ergebnis, dementsprechend gehen wir für EDA von einer relativ höheren Reaktivität als beispielsweise für Diethylentriamin (CASRN 111-40-0). Vergleicht man EDA mit strukturell weiter entfernten Aminen, sieht man, dass EDA weniger stark aktiv als alle anderen positiv getesteten Härter im KeratinoSens™ war, v.a. IPD (CASRN 2855-13-2) und AEP (CASRN 140-31-8; 6 bzw. 4fach niedrigere EC_{1,5} Werte, deswegen stärker reaktiv als EDA).

Die *in silico* Vorhersage mittels iSENS liefert EC₃ Werte im Grenzbereich der zwischen Kategorie HS und GMS (7,1-11 %).

EDA war einer der Inhaltsstoffe dessen Wirkstärke in Bayes-Netzwerk von Jaworska und Kollegen untersucht wurde und die Vorhersage als starker Hinweis gekennzeichnet war. Die ermittelte Wirkstärkekategorie innerhalb des Systems war „pEC₃ category.3“ (moderate Wirkstärke) und der vorhergesagte EC₃ Wert lag bei 1,6 %. Dieser Wert deutet in Richtung HS.

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie HS (Basis Tierdaten) wird beibehalten. Trotz der *in vitro* Tests, die teilweise in Richtung GMS weisen (2 x ARE-Test).

Anmerkung: immunologische Kreuzreaktivität zwischen Ethylendiamin, Diethylentriamin und/oder Triethylentetramin vermutet

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (H334 (R42): Atemwegssensibilisierung).

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): Ethylendiamin war Teil der durchgeführten Testreihe im KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

Testvorschlag: Die *in vitro* Reihentestung (h-CLAT) der aliphatischen Amine sollte auch Ethylendiamin umfassen, um die getroffene Bewertung zu bestätigen und einen aussagekräftigen relativen Vergleich der Amine zu gewährleisten (Referenzsubstanz).

7.1.4.2 Diethylentriamin (DETA), CASRN 111-40-0

→ ausreichend Tierdaten → <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (Biov. gering)
	2. Haptenisierung	Ja	Nein
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Auf Basis der Humanbefunde ist DETA als starkes Allergen zu bezeichnen (Ergebnis aus Human-Maximierungstests; seltenes Allergen unter den Amin-Härtern, jedoch hohe expositionsbezogene Sensibilisierungshäufigkeit (siehe Arbeitsschritt 4)). Es liegen keine neuen Tierdaten vor. Jedoch wurde mittlerweile eine Vielzahl an *in vitro* Tests mit DETA durchgeführt.

Verschiedene Tests erzielten dabei negative Ergebnisse (1 x DPRA, 1 x KeratinoSens™, 1 x h-CLAT). DETA ist ein Pro-Hapten (d.h. eine metabolische Aktivierung ist nötig für die Proteinreaktivität). Im *in chemico* Testsystem des DPRA gibt es keine metabolische Aktivierung, sodass keine bzw. eine geringe Reaktivität (zweiter DPRA nur 22,4 % Depletion) eines Pro-Haptens nicht überrascht. Diesen Grund beschrieb bereits (Emter et al., 2010). Die negativen Ergebnisse im KeratinoSens™ (als Teil der Reihentestung im vorliegenden Projekt) und h-CLAT weisen in Richtung einer geringen Aktivität.

Wie erwähnt, DETA war Teil der Reihentestung im KeratinoSens™. DETA liefert neben neun anderen von insgesamt 16 getesteten Härtern ein negatives Ergebnis und dementsprechend wird DETA im Vergleich zu den positiv getesteten EDA (CASRN 107-15-3) und Dipropylentriamin (CASRN 56-18-8) eine geringere Reaktivität unterstellt (möglicher Hinweis GMS).

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie HS (Basis Tierdaten) wird beibehalten. Zudem deutet immer mehr auf eine tendenziell etwas geringere Wirkstärke von Diethylentriamin im Vergleich zu Ethylendiamin hin.

Anmerkung: immunologische Kreuzreaktivität zwischen Ethylendiamin, Diethylentriamin und/oder Triethylentetramin vermutet

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): Diethylentriamin war Teil der durchgeführten Testreihe im KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

Testvorschlag: Die *in vitro* Reihentestung (h-CLAT) der aliphatischen Amine sollte auch Diethylentriamin umfassen, um die getroffene Bewertung zu bestätigen und einen aussagekräftigen relativen Vergleich der Amine zu gewährleisten.

7.1.4.3 Dipropylentriamin, CASRN 56-18-8

→ <i>in vivo</i> Tests → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Wenig	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Die vorliegenden Humandaten erlauben keine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke. Als Tierdaten liegen aus dem Vorläuferprojekt ein Test an Meerschweinchen (GPMT) und ein Test an Mäusen (LLNA) vor. Der GPMT weist in Richtung der Kategorie GMS, während der LLNA ausgeführt mit dem Vehikel Aceton einen EC3 Wert erzielt der eine Einordnung in die Kategorie HS stützen würde. Die Autoren der Studie wiesen aber bereits damals auf die Möglichkeit der Überschätzung der Wirkstärke durch das Vehikel Aceton hin (Gamer et al., 2008). Aus diesem Grund wurde für das vorliegende Projekt ein LLNA mit dem Vehikel AOO vorgeschlagen und durchgeführt. Auf Basis des erzielten EC3 Wertes von 3,9 % liefert auch dieser Test an Mäusen einen Hinweis auf die Einordnung in die Kategorie HS.

Die Bioverfügbarkeit für Dipropylentriamin kann als noch gut vorhergesagt werden, erscheint aber im Vergleich mit den anderen Härten eher mittelmäßig. Dipropylentriamin liefert als einer von sechs der insgesamt 16 geprüften Härtern ein positives Ergebnis im KeratinoSens™ (als Teil der Reihentestung im vorliegenden Projekt). Der relative Vergleich der Ergebnisse der getesteten aliphatischen Amine zeigt für Dipropylentriamin die stärkste Aktivität (EDA ebenfalls positiv getestet, aber niedrigere EC1,5 Wert [μM]; negativ getestet wurden DETA, TMD, Triethylentetramin, N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan sowie Tetraethylenpentamin).

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie U (Basis widersprüchlichen Tierdaten) wird zunächst beibehalten. Als Default-Vorgehen wird für den so zu bewertenden Inhaltsstoff in unserem Ansatz eine hohe Sensibilisierungsstärke unterstellt. Allerdings deuten die neuen Ergebnisse darauf hin, dass es tatsächlich eine Tendenz gibt in Richtung HS (LLNA in AOO, EC1,5 des KeratinoSens™ in gleicher Größenordnung wie für EDA).

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): Dipropylentriamin war Teil der durchgeführten Testreihe im LLNA und KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

Testvorschlag: Die *in vitro* Reihentestung (h-CLAT) der aliphatischen Amine sollte auch Dipropylentriamin umfassen, um einen relativen Vergleich der Amine anstellen zu können.

7.1.4.4 Trimethylhexamethylendiamin (TMD, Trimethylhexan-1,6-diamin), CASRN 25620-58-0, auch CASRN 25513-64-8

→ ausreichend <i>in vivo</i> Tests → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptensierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Die vorliegenden Humandaten erlauben keine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke. Offenbar liegt TMD jedoch weit verbreitet vor, allerdings finden sich nur wenige Fälle von Sensibilisierung. Dies könnte ein Hinweis auf eine geringere sensibilisierende Wirkstärke sein. Bis auf ein Testergebnis aus einem nicht radioaktiven Test an Mäusen (LLNC) für den noch keine cut-off Werte für eine quantitative Auswertung zur Verfügung stehen, liegen keine neueren Tierdaten vor.

TMD war Teil der Reihentestung im KeratinoSens™. TMD liefert neben neun anderen von insgesamt 16 getesteten Härtern ein negatives Ergebnis und dementsprechend wird TMD im Vergleich zu den positiv getesteten EDA (CASRN 107-15-3) und Dipropylentriamin (CASRN 56-18-8) eine geringere Reaktivität unterstellt.

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie HS (Basis Tierdaten) wird beibehalten. Das negative Ergebnis im KeratinoSens™ könnte jedoch auf eine leicht geringere Aktivität als beispielsweise für EDA oder Dipropylentriamin hinweisen.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): TMD war Teil der durchgeführten Testreihe im KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

Testvorschlag: Die *in vitro* Reihentestung (h-CLAT) der aliphatischen Amine sollte auch TMD umfassen, um einen relativen Vergleich der Amine anstellen zu können.

7.1.4.5 Triethylentetramin (TETA), CASRN 112-24-3

→ ausreichend Tierdaten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (Biov. gering)
	2. Haptisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Die vorliegenden Humandaten erlauben keine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke. Als Tierdaten liegen aus dem Vorläuferprojekt mehrere Tests an Meerschweinchen (GPMT und Bühler) vor. Die Ergebnisse aus zwei GPMT lassen eine Einordnung in die Kategorie HS zu. Bei zwei weiteren GPMT und dem Bühler Test kann aus formalen Gründen (Induktionskonzentration > 1 %) trotz der stark positiven Reaktionen der Versuchstiere formal nur eine Einordnung in die Gruppe GMS stattfinden.

Die Bioverfügbarkeit für TETA wird als gering abgeschätzt. Wie erwähnt, DETA war Teil der Reihentestung im KeratinoSens™. DETA liefert neben neun anderen von insgesamt 16 getesteten Härtern ein negatives Ergebnis und dementsprechend wird DETA im Vergleich zu den positiv getesteten EDA (CASRN 107-15-3) und Dipropylentriamin (CASRN 56-18-8) eine geringere Reaktivität unterstellt (möglicher Hinweis GMS).

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie HS (Basis Mehrzahl Tierdaten) wird beibehalten (Versuche mit Einordnung GMS sprechen dem nicht entgegen, da GMS nur aus formalen Gründen vergeben wurde (Studiendesign)). Das negative Ergebnis im KeratinoSens™ könnte jedoch auf eine leicht geringere Aktivität als beispielsweise für EDA oder Dipropylentriamin hinweisen.

Anmerkung: immunologische Kreuzreaktivität zwischen Ethylendiamin, Diethylentriamin und/oder Triethylentetramin vermutet

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): Triethylentetramin war Teil der durchgeführten Testreihe im KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

Testvorschlag: Die *in vitro* Reihentestung (h-CLAT) der aliphatischen Amine sollte auch Triethylentetramin umfassen, um einen relativen Vergleich der Amine anstellen zu können.

7.1.4.6 N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan, CASRN 109-55-7

→ ausreichend Tierdaten → <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Nein
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Nein
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	Ja	Ja (moderat)

Die vorliegenden Humandaten erlauben keine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke. In einem Ranking-System auf Basis von Humandaten (Basketter et al., 2014) wird der Inhaltsstoff in Kategorie 2 (Strong intrinsic sensitising properties)²⁸ klassiert (siehe Abschnitt 1.4.1). Dies steht etwas im Gegensatz zu einer Einschätzung derselben Autoren aus dem Jahr 2006, hier wurde die Substanz als moderat humansensibilisierend bezeichnet (Basketter und Kimber, 2006).

Als Tierdaten liegen aus dem Vorläuferprojekt mehrere Meerschweinchentests (2 x GPMT, Bühler Test) zeigten positive Wirkung, jedoch mit eher geringer Wirkstärke (GMS). Im LLNA mit sieben unterschiedlichen Vehikeln wurden EC3 Werte zwischen 1,7 und > 10 % ermittelt. In sechs Versuchen resultierte daraus die Einstufung HS, in einem Fall die Zuordnung GMS.

Die Bioverfügbarkeit wurde als mittelmäßig eingeschätzt. In DPRA-Tests zeigte sich eine nur geringe Reaktivität (Cys: 8-10 %, Lys: 0 %). Der Inhaltsstoff ist ein Pro-Hapten (d.h. eine metabolische Aktivierung ist nötig für die Proteinreaktivität). Im *in chemico* Testsystem des DPRA gibt es keine metabolische Aktivierung, sodass keine bzw. eine geringe Reaktivität eines Pro-Haptens nicht überrascht.

Für den KeratinoSens™ (als Teil der Reihentestung im vorliegenden Projekt), sowie die weiteren vorliegenden *in vitro* Tests, die die Reifung dendritischer Zellen (h-CLAT, MUSST) überprüfen, kann keine quantitative Auswertung erfolgen, da validierte Cut-Off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen. Im h-CLAT (2 Tests) zeigte sich qualitativ ein positives Ergebnis, während im MUSST ein negatives Ergebnis erzielt wurde – theoretisch könnte sich dieser Unterscheid aus einer unterschiedlichen metabolischen Kapazität der unterschiedlichen Monozytenzelllinien (THP-1 (h-CLAT), U937 (MUSST)) ergeben.

N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan war wie oben bereits erwähnt Teil der Reihentestung im KeratinoSens™. Der Inhaltsstoff liefert neben neun anderen von insgesamt 16 getesteten Härtern ein negatives Ergebnis und dementsprechend wird N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan im Vergleich zu den positiv getesteten EDA (CASRN 107-15-3) und Dipropylentriamin (CASRN 56-18-8) eine geringere Reaktivität unterstellt (möglicher Hinweis GMS).

²⁸ Regelmäßiger Kontakt mit mittleren Konzentrationen führt zu 1-10 % Sensibilisierung, bei niedrigen Konzentrationen relativ sicher. Bedingungen: NOEL (No Observed Effect Level) im HRIPT 25-500 µg/cm².

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie U (Basis viele Daten, jedoch widersprüchlich, Tendenz GMS) wird beibehalten. Auch die neuen Daten konnten die Widersprüchlichkeit der Daten die sich letztlich auch in der Bewertung ausdrückt nicht aufheben.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan war Teil der durchgeführten Testreihe im KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

Testvorschlag: Die *in vitro* Reihentestung (h-CLAT) der aliphatischen Amine sollte auch N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan umfassen, um einen relativen Vergleich der Amine anstellen zu können.

7.1.4.7 Tetraethylenpentamin (TEPA), CASRN 112-57-2

→ nur 2 <i>in vivo</i> Tests → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Wenig	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 2 Tests)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (Biov. gering)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Die vorliegenden Humandaten erlauben keine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke. Als Tierdaten liegen aus dem Vorläuferprojekt zwei Versuche an Meerschweinchen (GPMT) vor, die widersprüchliche Ergebnisse liefern (ein GPMT führt zu Kategorie HS, ein GPMT weist ein negatives Testergebnis auf).

Die Bioverfügbarkeit von TEPA wird als gering eingeschätzt. TEPA war Teil der Reihentestung im KeratinoSens™. Der Inhaltsstoff liefert neben neun anderen von insgesamt 16 getesteten Härtern ein negatives Ergebnis und dementsprechend wird N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan im Vergleich zu den positiv getesteten EDA (CASRN 107-15-3) und Dipropylentriamin (CASRN 56-18-8) eine geringere Reaktivität unterstellt (möglicher Hinweis GMS).

Fazit: Die bereits bestehende Zuordnung in die Kategorie GMS wird beibehalten (Basis: vergleichende Daten von Leung und Auletta (1997)²⁹, geringen Bioverfügbarkeit, keine reaktiven Metaboliten in QSAR Toolbox identifiziert). Der neu durchgeführte *in vitro* Test bestätigt zudem die Zuordnung in die Kategorie GMS.

Anmerkung: Eine Kreuzreaktivität zwischen Ethylendiamin und Tetraethylenpentaamin wird berichtet (siehe FP-0324, Teilprojekt 5.4.3).

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): TEPA war Teil der durchgeführten Testreihe im KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

Testvorschlag: Die *in vitro* Reihentestung (h-CLAT) der aliphatischen Amine sollte auch TEPA umfassen, um einen relativen Vergleich der Amine anstellen zu können.

7.1.4.8 Pentaethylenhexamin (PEHA), CASRN 4067-16-7

→ nur 1 <i>in vivo</i> Test → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (Biov. gering)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Für Pentaethylenhexamin liegen keine neuen Informationen vor.

Fazit: Die bereits bestehende Zuordnung in die Kategorie GMS wird beibehalten (Basis: vergleichende Daten von Leung und Auletta (1997), geringe Bioverfügbarkeit, keine reaktiven Metaboliten in QSAR Toolbox identifiziert).

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): Pentaethylenhexamin war für die Testung im KeratinoSens™ vorgesehen worden, es war jedoch nicht möglich Testmaterial zu erhalten.

²⁹ Kurzübersicht der normalisierten Ergebnisse aus dem GPMT von Leung und Auletta, 1997

Substanz (CAS Nr.)	Epikutane Ind. [%].	Auslösedosis [%]	% positiver Tiere	Normalisierte Antwort
EDA (107-15-3)	10	5	45	0,9
DETA (111-40-0)	50	25	80	0,064
AEP (140-31-8)	50	25	25	0,02
TETA (112-24-3)	95	50	74	0,016
PEHA (4067-16-7)	100	100	100	0,01
TEPA (112-57-2)	60	50	5	0,002

Intradernale Induktionsdosis jeweils 5 % in Wasser; Ind.: Induktionsdosis; Normalisierung erfolgt über: Normalisierte Antwort = % Antwort / (epikutane Induktionsdosis)*(Auslösedosis); Maximum liegt bei 2

Testvorschlag: Die *in vitro* Reihentestung (KeratioSens™ und h-CLAT) der aliphatischen Amine sollte auch Pentaethylenhexamin umfassen, um die getroffene Bewertung zu bestätigen und einen aussagekräftigen relativen Vergleich der Amine zu gewährleisten.

7.1.4.9 Polyethylenpolyamin, CASRN 68131-73-7

→ kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Nein	-
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (Biov. gering)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Für Polyethylenpolyamin liegen keine neuen Informationen vor.

Fazit: Die bereits bestehende Zuordnung in die Kategorie GMS wird beibehalten (Basis: mechanistische Erklärung aus Leung und Auletta (1997)³⁰).

Anmerkung: Die Zuordnung in die Kategorie GMS hat nur Bestand unter der Voraussetzung, dass der Konzentrationswert der Monomere insgesamt die allgemeine Grenze von 0,1 % nicht erreicht bzw. überschreitet. Falls dies doch der Fall sein sollte, ist die Bewertung des Monomers heranzuziehen.

7.1.4.10 Polyethylenamin, CASRN 26336-38-9 (Monomer CASRN 593-67-9)

		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		–	–
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	–	–
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	Metabolit	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

³⁰ Die sensibilisierende Wirkstärke der Amine nimmt mit zunehmender Kettenlänge ab. Dies ist zudem mechanistisch erklärbar, denn die Aktivierung der Pro-Haptene durch die Monoaminoxidasen nimmt ebenfalls mit zunehmender Kettenlänge ab.

Für Polyethylenamin liegen keine neuen Informationen vor.

Fazit: Die bereits bestehende Zuordnung in die Kategorie GMS wird beibehalten (Basis: mechanistische Erklärung aus Leung und Auletta (1997; siehe oben)).

Anmerkung: Die Zuordnung in die Kategorie GMS hat nur Bestand unter der Voraussetzung, dass der Konzentrationswert der Monomere insgesamt die allgemeine Grenze von 0,1 % nicht erreicht bzw. überschreitet. Falls dies doch der Fall sein sollte, ist die Bewertung des Monomers heranzuziehen.

7.1.4.11 N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin, (Bis(aminopropyl)laurylamin), CASRN 2372-82-9

→ nur 1 <i>in vivo</i> Tests → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Ja (Biov. gering)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Insgesamt liegen nur wenige Informationen zur Sensibilisierung beim Menschen vor. Diese Daten reichen nicht aus, um eine abschließende Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke durchzuführen.

Beim einzigen vorhandenen Tierversuch handelt es sich um einen Bühler Test. Bei einer epikutanen Induktionsdosis von 0,33 % wurde zu den Ablesezeitpunkten kein Tier mit positiver Hautreaktion identifiziert. Das Ergebnis deutet demnach in Richtung GMS.

Anhand der Informationen zum $\log K_{O/W}$ (4,46) und dem $\log K_p$ (-1,52) berechnet mit der EpiSuite™ kann die Bioverfügbarkeit abgeschätzt werden. Während der $\log K_{O/W}$ am Rande des Bereichs für eine gute Bioverfügbarkeit liegt, geht man anhand des $\log K_p$ Wertes von einer guten Bioverfügbarkeit aus. Im Registrierungsdossier weisen die Ergebnisse einer dermalen Absorptionsstudie jedoch auf eine geringe dermale Absorption hin (0,92 % der applizierten Dosis dringt innerhalb von 24 h in das Stratum corneum ein).

In silico Ergebnisse liegen nur in Bezug auf die Proteinreaktivität vor. In TOXTREE wird für den Inhaltsstoff, genau wie für Ethylendiamin (EDA) und Diethylentriamin (DETA), die Schiffbasenbildung als Proteinreaktionsmechanismus vorhergesagt. Die QSAR Toolbox findet, dass wiederum nicht der Inhaltsstoff selbst, sondern dessen Metaboliten proteinreaktiv sind und es sich somit auch im Fall von N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin um ein Pro-Hapten handelt. Die QSAR Toolbox Vorhersage in Bezug auf Peptidreaktivität gegenüber Lysin und Cystein, besagt wiederum keine Reaktivität für den Inhaltsstoff selbst. Einige Metaboliten reagieren jedoch mit Cystein („low“ (drei Metaboliten)

– „moderate“ (ein Metabolit)) oder Lysin („moderate“ (ein Metabolit) – „high“ (ein Metabolit).

Fazit: Auf Basis der wenigen verfügbaren Daten erfolgt eine Zuordnung in die Kategorie U. Somit wird dem Inhaltsstoff defaultmäßig eine hohe Sensibilisierungsstärke unterstellt.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (Skin Corr 1B, H314; STOT RE 2 (kidney), H373).

7.1.5 Härter, cycloaliphatische Amine

7.1.5.1 4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM), CASRN 1761-71-3

→ <i>in vivo</i> Tests → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (teilweise)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Ja (gute Blöv.)
	2. Haptensierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	–	– (keine Reaktivität)
	Molcode (LLNA)	–	–

Die vorliegenden Humandaten erlauben keine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke. Als Tierdaten liegt aus dem Vorläuferprojekt ein Test an Meerschweinchen (GPMT) vor, der eine Einordnung in die Kategorie GMS erlaubt. Zwei weitere Tests sind quantitativ nicht auswertbar.

Die Bioverfügbarkeit wird als gut eingeschätzt. PACM war Teil der Reihentestung im KeratinoSens™ und liefert neben neun anderen von insgesamt 16 getesteten Härtern ein negatives Ergebnis. Es kann keine quantitative Auswertung für diesen *in vitro* Test erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen. Ein relativer Vergleich scheint mechanistisch nur mit sehr eng verwandten Aminen sinnvoll, d.h. mit cycloaliphatischen Aminen. Die cycloaliphatischen Amine IPD (CASRN 2855-13-2) und AEP (CASRN 140-31-8) sind insgesamt die am stärksten reagierenden Härter und dementsprechend wird PACM im Vergleich zu diesen eine geringere Reaktivität unterstellt (möglicher Hinweis GMS).

Fazit: Auf Basis der wenigen verfügbaren Daten bleibt die Zuordnung in die Kategorie U zunächst bestehen (Default HS). Die Hinweise auf eine Tendenzen in Richtung GMS (Basis: GPMT Ergebnis → GMS; QSAR Toolbox - keine Proteinreaktivität des Inhaltsstoffes oder dessen Metaboliten) wurden durch das negative Ergebnis im KeratinoSens™ gestärkt.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): 4,4'-Diaminocyclohexylmethan war Teil der durchgeführten Testreihe im KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

7.1.5.2 Bis(4-(1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethylamino)-3-methylcyclohexyl)methan, CASRN 136210-32-7

→ nur 1 <i>in vivo</i> Tests → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (Biov. gering)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	–	– (keine Reaktivität)
	Molcode (LLNA)	–	–

Insgesamt liegen nur wenige Informationen zur Sensibilisierung beim Menschen vor. Diese Daten reichen nicht aus, um eine abschließende Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke durchzuführen.

Beim einzigen vorhandenen Tierversuch handelt es sich um einen GPM Test. Aus formalen Gründen erfolgte eine Einordnung der erzielten Ergebnisse in die Kategorie GMS. Die Einstufung beruht auf dem gewählten Studiendesign. Durch die Verwendung einer intradermalen Induktionsdosis von > 1 % kann formal keine Einstufung in die Kategorie HS erfolgen. Im Test zeigten 85 % der verwendeten Tiere bei einer 5 %igen Induktionsdosis eine positive Hautreaktion.

Zur Bioverfügbarkeit liegen teilweise widersprüchliche Informationen vor, sie wird jedoch als eher gering eingestuft. Es liegen keine weiteren *in vitro* Prüfungen vor. Weder in der Toolbox noch in Toxtree wird eine Proteinreaktivität vorhergesagt. Auch nach Anwendung des Metabolismussimulators, der drei mögliche Metaboliten identifiziert, finden sich keine Hinweise auf eine Proteinreaktivität.

Fazit: Auf Basis der wenigen verfügbaren Daten bleibt die Zuordnung in die Kategorie U zunächst bestehen (Default HS). Allerdings kann ein erster Hinweis auf die Kategorie GMS (U (→ GMS)) gegeben werden (Basis: geringe Bioverfügbarkeit, QSAR Toolbox - keine Proteinreaktivität des Inhaltsstoffes oder dessen Metaboliten).

7.1.5.3 N-Aminoethylpiperazin (AEP), 2-Piperazin-1-ylamin, CASRN 140-31-8

→ nur 2 <i>in vivo</i> Tests → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Wenig	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 2 Tests)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Die vorliegenden Humandaten erlauben keine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke, allerdings lassen neue Daten den Schluss zu, dass AEP ein seltenes Humanallergen bei offenbar weiter Verbreitung (zumindest im Baugewerbe) ist. Die aus dem Vorläuferprojekt vorhandenen Tierdaten (2 x GPMT) liefern widersprüchliche Daten (1 x HS und 1 x GMS, allerdings nur auf formaler Basis wegen Beschränkung durch das Studiendesign (Induktionsdosis > 1 %)).

Die Bioverfügbarkeit für AEP wird als gut bewertet. AEP liefert als einer von sechs der insgesamt 16 geprüften Härtern ein positives Ergebnis im KeratinoSens™ (als Teil der Reihentestung im vorliegenden Projekt). Es kann keine quantitative Auswertung für diesen *in vitro* Test erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen. Der relative Vergleich der Ergebnisse der getesteten cycloaliphatischen Amine zeigt für AEP das zweit höchste Ergebnis nach IPD (CASRN 2855-13-2). Dementsprechend gehen wir für AEP von einer relativ höheren Reaktivität als beispielsweise für das im Test negative cycloaliphatische PACM (CASRN 1761-71-3) aus. Vergleicht man AEP mit strukturell weiter entfernten Aminen, sieht man, dass AEP stärker aktiv als alle anderen positiv getesteten Härter im KeratinoSens™ war (bis zu 4fach niedrigerer EC_{1,5} Wert, deswegen stärker reaktiv als beispielsweise EDA (CASRN 107-15-3)).

Fazit: Auf Basis der wenigen und teilweise widersprüchlichen Daten bleibt die Zuordnung in die Kategorie U zunächst bestehen (Default HS). Allerdings wird ein erster Hinweis auf die Kategorie HS vergeben (U (→ HS)) auf Basis des GPMT der in Richtung HS weist und der vergleichbaren Reaktivität mit dem strukturell enger verwandten IPD.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): AEP war Teil der durchgeführten Testreihe im KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

Testvorschlag: Die *in vitro* Reihentestung (h-CLAT) der aliphatischen und cycloaliphatischen Amine sollte auch 3-Cyclohexylaminopropylamin umfassen, um einen relativen Vergleich der Amine zu gewährleisten (v.a. cycloaliphatischen Härter 3-Cyclohexylaminopropylamin).

7.1.5.4 Isophorondiamin (IPD), 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin, CASRN 2-855-13-2

→ ausreichend Tierdaten → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

IPD ist eines der häufigeren Allergene unter den Härtern bei gleichzeitig weiter Verbreitung. An neuen tierexperimentellen Daten liegt das Testergebnis aus dem im vorliegenden Projekt durchgeführten LLNA vor. Der ermittelte EC3 Wert von 4.1 % deutet in Richtung der Kategorie HS. Zudem liegt noch ein Testergebnis aus einem nicht radioaktiven Test an Mäusen (LNCC) vor, für den noch keine cut-off Werte für eine quantitative Auswertung zur Verfügung stehen.

Die Bioverfügbarkeit für IPD wird als gut bewertet. IPD liefert als einer von sechs der insgesamt 16 geprüften Härtern ein positives Ergebnis im KeratinoSens™ (als Teil der Reihentestung im vorliegenden Projekt). Es kann keine quantitative Auswertung für diesen *in vitro* Test erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen. Der relative Vergleich der Ergebnisse zeigt für IPD den niedrigsten EC1,5 Wert aller positiv getesteten Härter (bis zu 6fach niedrigerer EC1,5 Wert, deswegen stärker reaktiv als z.B. EDA (CASRN 107-15-3)). Dementsprechend gehen wir für IPD von einer relativ höheren Reaktivität als beispielsweise für das im Test negative cycloaliphatische PACM (CASRN 1761-71-3) aus.

Fazit: Auf bestehende Zuordnung in die Kategorie HS wird beibehalten (Basis Human – und Tierdaten).

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): IPD war Teil der durchgeführten Testreihe im LLNA und KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

Testvorschlag: Die *in vitro* Reihentestung (h-CLAT) der aliphatischen und cycloaliphatischen Amine sollte auch IPD umfassen, um einen relativen Vergleich der Amine zu gewährleisten.

7.1.5.5 3-Cyclohexylaminopropylamin, CASRN 3312-60-5

		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		–	–
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine neuen Daten vor.

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie U (Basis wenig Daten, Default HS) wird beibehalten.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): 3-Cyclohexylaminopropylamin war für die Testung im KeratinoSens™ vorgesehen worden. Die Testung konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da das Testmaterial nicht (rechtzeitig) zur Verfügung stand.

Testvorschlag: Die *in vitro* Reihentestung (h-CLAT) der aliphatischen und cycloaliphatischen Amine sollte auch 3-Cyclohexylaminopropylamin umfassen, um einen relativen Vergleich der Amine zu gewährleisten (v.a. cycloaliphatischen Härter AEP).

7.1.5.6 1,2-Diaminocyclohexan (DCH, Cyclohex-1,2-ylendiamin), CASRN 694-83-7

→ ausreichend <i>in vivo</i> Test → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Wenig	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (teilweise)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	Metabolit	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

DCH ist bisher beim Menschen kaum allergologisch untersucht worden, eine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke ist demnach nicht möglich. Neben den widersprüchlichen Tierdaten aus dem Vorläuferprojekt liegt noch eine zusätzliche tierexperimentelle Studie aus dem Registrierungsdossier vor, diese kann jedoch quantitativ nicht ausgewertet werden

(problematisches Studiendesign). Zudem liegt noch ein Testergebnis aus einem nicht radioaktiven Test an Mäusen vor, für den noch keine cut-off Werte für eine quantitative Auswertung zur Verfügung stehen.

Die Bioverfügbarkeit wird als gut bewertet, im Vergleich mit den anderen Härten jedoch nur als mittelmäßig. Es liegen keine weiteren *in vitro* Testungen vor.

DCH war einer der Inhaltsstoffe dessen Wirkstärke in Bayes-Netzwerk von Jaworska und Kollegen untersucht wurde und die Vorhersage als starker Hinweis gekennzeichnet war. Die ermittelte Wirkstärkekategorie innerhalb des Systems war „pEC3 category.1“ (nicht sensibilisierend, berechneter EC3 Wert 101 %). Wie angedeutet liegen für diesen Inhaltsstoff keine *in vitro* Daten vor und dementsprechend ist die Vorhersage für DCH stark von den abgefragten strukturellen Merkmalen, sowie der integrierten Vorhersage aus dem Expertensystem TIMES (siehe FP-0324, Teilprojekt 5.1, Abschnitt 1.4.5 TIMES-SS) abhängig. Da die Plattform TIMES nicht frei verfügbar ist können die Hintergründe nicht weiter überprüft werden.

Fazit: Auf Basis der teilweise widersprüchlichen Daten bleibt die Zuordnung in die Kategorie U zunächst bestehen (Default HS).

7.1.5.7 1,3-Cyclohexylen-bis-methylamin, CASRN 2579-20-6

→ nur 1 <i>in vivo</i> Test → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	Metabolit	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine Informationen zur Sensibilisierung beim Menschen vor.

Beim einzigen vorhandenen Tierversuch handelt es sich um einen GPMT. Bei einer intradermalen Induktionsdosis von 0,05 % wurde zu den Ablesezeitpunkten kein Tier mit positiver Hautreaktion identifiziert. Das Ergebnis deutet demnach in Richtung GMS.

Anhand der Informationen zum log $K_{O/W}$ (1,07 bzw. 0,783) und dem log K_P (-2,89 bzw. -3,08) aus der EpiSuite™ und dem Registrierungsdossier kann die Bioverfügbarkeit abgeschätzt werden. Insgesamt wird diese als gut bewertet.

In silico Ergebnisse liegen nur in Bezug auf die Proteinreaktivität vor. In TOXTREE wird für den Inhaltsstoff, genau wie für die anderen cycloaliphatischen Amine, die Schiffbasenbildung als Proteinreaktionsmechanismus vorhergesagt. Die QSAR Toolbox findet, dass wiederum nicht der Inhaltsstoff selbst, sondern dessen Metaboliten proteinreaktiv sind und es sich somit auch im Fall von 1,3-Cyclohexylen-bis-methylamin um ein Pro-Hapten handelt. Die

QSAR Toolbox Vorhersage in Bezug auf Peptidreaktivität gegenüber Lysin und Cystein, besagt wiederum keine Reaktivität für den Inhaltsstoff selbst. Einige Metaboliten reagieren mit Cystein („low reactivity“), jedoch nicht mit Lysin-haltigen Peptiden.

Fazit: Auf Basis der wenigen verfügbaren Daten erfolgt eine Zuordnung in die Kategorie U. Somit wird dem Inhaltsstoff defaultmäßig eine hohe Sensibilisierungsstärke unterstellt.

7.1.6 Härter, sonstige

7.1.6.1 m-Xylidendiamin (MXDA), CASRN 1477-55-0

→ ausreichend Tierdaten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Unter den Härtern ist MXDA das häufigste Humanallergen und in Epoxidharz-Produkten für das Baugewerbe weit verbreitet. Die aus dem Vorläuferprojekt bekannten tierexperimentellen Daten bestätigen meist die stark sensibilisierende Wirkung von MXDA (2 x LLNA: jeweils Kategorie HS, 1 x GPMT: Kategorie HS, 1 x GPMT quantitativ nicht auswertbar; Nicht-Adjuvans Test negatives Ergebnis). Zudem liegt noch ein Testergebnis aus einem nicht radioaktiven Test an Mäusen (LNCC) vor, für den noch keine cut-off Werte für eine quantitative Auswertung zur Verfügung stehen.

Die Bioverfügbarkeit wird als gut bewertet, im Vergleich mit den anderen Härtern jedoch nur als mittelmäßig. Es liegen keine weiteren *in vitro* Testungen vor. In der QSAR Toolbox wurden neben den Schiff Basen Mechanismus auch noch die Michael Addition oder der S_N2 Mechanismus als mögliche Reaktionen zur Proteinreaktivität für bestimmte Metaboliten identifiziert.

MXDA war einer der Inhaltsstoffe dessen Wirkstärke in Bayes-Netzwerk von Jaworska und Kollegen untersucht wurde und die Vorhersage als starker Hinweis gekennzeichnet war. Die ermittelte Wirkstärkekategorie innerhalb des Systems war „pEC3 category.1“ (nicht sensibilisierend, berechneter EC3 Wert 101 %). Wie angedeutet liegen für diesen Inhaltsstoff keine *in vitro* Daten vor und dementsprechend ist die Vorhersage für MXDA stark von den abgefragten strukturellen Merkmalen, sowie der integrierten Vorhersage aus dem Expertensystem TIMES (siehe FP-0324, Teilprojekt 5.1, Abschnitt 1.4.5 TIMES-SS) abhängig. Da die Plattform TIMES nicht frei verfügbar ist können die Hintergründe nicht weiter überprüft werden.

Fazit: Die Zuordnung in die Kategorie HS bleibt bestehen (Basis: „weight of evidence“, gesehene Widersprüche werden der Mehrheit der Ergebnisse untergeordnet, *in silico* Vorhersage wird abgelehnt³¹).

7.1.6.2 m-Xylylendiamin/Acrylonitril-Addukt, CASRN 73050-11-0 (CASRN 90530-16-8)

→ nur 1 <i>in vivo</i> Test → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	–	–
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	5. T-Zellreaktion	–	–
	Mechanistische Domäne	–	–
	Molcode (LLNA)	–	–

Im Vorläuferprojekt wurden keine Daten identifiziert. Aus dem vorliegenden Projekt liegt das Testergebnis aus einem Tierexperiment (LLNA) vor. Der ermittelte EC3 Wert von > 10 % deutet in Richtung der Kategorie GMS.

Weiterhin war der Inhaltsstoff Teil der Reihentestung im KeratinoSens™ und liefert neben neun anderen von insgesamt 16 getesteten Härtern ein negatives Ergebnis. Es kann keine quantitative Auswertung für diesen *in vitro* Test erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen. Ein relativer Vergleich scheint mechanistisch nur mit sehr eng verwandten Aminen sinnvoll. Im Fall des m-Xylylendiamin/Acrylonitril-Addukt könnte man im weiteren Sinne noch die cycloaliphatischen Aminen oder den oligomerisierten Härter (CASRN 38294-64-3) vergleichend heranziehen. Die cycloaliphatischen Amine IPD (CASRN 2855-13-2) und AEP (CASRN 140-31-8) sind insgesamt die am stärksten reagierenden Härter und dementsprechend wird dem m-Xylylendiamin/Acrylonitril-Addukt im Vergleich zu diesen eine geringere Reaktivität unterstellt (möglicher Hinweis GMS).

Es liegen keine weiteren Daten vor. Auch *in silico* Analysen konnten nicht erfolgen, da die zugeordneten CAS-Nummern in der Software nicht mit einer eindeutigen Struktur verbunden war.

Fazit: Auf Basis der wenigen verfügbaren Daten bleibt die Zuordnung in die Kategorie U zunächst bestehen (Default HS). Allerdings wird auf Basis der neu generierten Daten der Hinweis GMS vergeben.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): m-Xylylendiamin/Acrylonitril Addukt war Teil der durchgeführten Testreihe im LLNA und KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

³¹ Basis: die vorhandene Humandaten und die Mehrzahl der tierexperimentellen Daten weisen auf eine starke sensibilisierende Wirkstärke hin

Testvorschlag: Die Prüfung des m-Xylylendiamin/Acrylonitril Adduktes innerhalb der Reihentestung der Härter im h-CLAT wäre zu begrüßen.

7.1.6.3 N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan, N-(3-(trimethoxysilyl)propyl)-ethylendiamin, CASRN 1760-24-3

→ ausreichend Tierdaten → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (Biov. gering)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine Informationen zur Sensibilisierung beim Menschen vor.

Mittlerweile wurden einige tierexperimentelle Studien im Registrierungsdossier der Substanz veröffentlicht (2 x GPMT; 1 x LLNA). Ein GPMT zeigt ein stark positives Ergebnis, 0,5% intradermale Induktionskonzentration in Wasser zeigt nach Auslösebehandlung zu Ablesezeitpunkten bei 100 % der Tiere eine Hautreaktion (beachte möglichen Einfluss der Hydrolyse, siehe 0), der zweite GPMT in Paraffin hingegen weist eine deutlich geringe Wirkstärke auf (Untergrenze HS). Die Ergebnisse aus dem LLNA schließlich weisen eindeutig in Richtung GMS.

Weiterhin war der Inhaltsstoff Teil der Reihentestung im KeratinoSens™ und liefert neben neun anderen von insgesamt 16 getesteten Härtern ein negatives Ergebnis. Es kann keine quantitative Auswertung für diesen *in vitro* Test erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen. Ein relativer Vergleich ist mechanistisch nur mit sehr eng verwandten Aminen sinnvoll. Dem N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan strukturell am nächsten wäre das 3-Aminopropyltriethoxysilan (CASRN 919-30-2). Für diesen Inhaltsstoff liegt jedoch kein Ergebnis aus dem KeratinoSens™ vor. Allerdings wird auf Basis von *in silico* Vorhersagen für diesen Inhaltsstoff und dessen Metaboliten von keiner nennenswerten Reaktivität gegenüber Cystein ausgegangen und somit wäre ein negatives Ergebnis im KeratinoSens™ zu erwarten. Insgesamt wird somit N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan im Vergleich zu den im KeratinoSens™ positiv getesteten Härtern eine geringere Reaktivität unterstellt (möglicher Hinweis GMS).

Fazit: Auf Basis der wesentlich verbesserten Datenlage (Registrierungsdossier 2013 und neu generierte Daten), jedoch der teilweise widersprüchlichen Daten erfolgt zunächst eine Zuordnung in die Kategorie U (Default HS). Allerdings wird auf Basis der Mehrheit der Daten der Hinweise GMS vergeben.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan war Teil der durchgeführten Testreihe im KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

7.1.6.4 Polyoxyalkylenamin, 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan, CASRN 2997-01-5

→ kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		–	–
<i>-In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine Informationen zur Sensibilisierung beim Menschen oder aus Tierversuchen vor.

Die Bioverfügbarkeit wird als gut bewertet, im Vergleich mit den anderen Härten jedoch eher am unteren Rand der Skala. 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan liefert als einer von sechs der insgesamt 16 geprüften Härtern ein positives Ergebnis im KeratinoSens™ (als Teil der Reihentestung im vorliegenden Projekt). Es kann keine quantitative Auswertung für diesen *in vitro* Test erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen. Der relative Vergleich der Ergebnisse zeigt für den Inhaltsstoff einen ähnlich niedrigen EC_{1,5} Wert wie für IPD (CASRN 2855-13-2) und AEP (CASRN 140-31-8), dementsprechend wird ebenfalls von einer relativ höheren Reaktivität als beispielsweise für die ebenfalls positiven und strukturell etwas verwandten aliphatischen Amine Dipropylentriamin (CASRN 56-18-8) und EDA (CASRN 107-15-3) oder gar die negative getesteten Härter ausgegangen.

1,10-Diamino-4,7,dioxadecan war einer der Inhaltsstoffe dessen Wirkstärke in Bayes-Netzwerk von Jaworska und Kollegen untersucht wurde und die Vorhersage als starker Hinweis gekennzeichnet war. Die ermittelte Wirkstärkekategorie innerhalb des Systems war „pEC₃ category.2“ (schwach sensibilisierend, berechneter EC₃ Wert 25,6 %). Neben den strukturellen Merkmalen, sowie der integrierten Vorhersage aus dem Expertensystem TIMES (siehe FP-0324, Teilprojekt 5.1, Abschnitt 1.4.5 TIMES-SS) flossen die Ergebnisse aus der oben beschriebenen *in vitro* Testung in die Vorhersage mit ein. Die Vorhersage kann somit als Hinweis auf die Kategorie GMS gewertet werden.

Fazit: Auf Basis der weiterhin dürftigen Datenlage bleibt die Zuordnung in die Kategorie U (Default HS) bestehen. Allerdings wird ein erster Hinweis auf die Kategorie GMS vergeben (U → GMS)) auf Basis der Vorhersage aus dem Bayes-Netzwerk.

Anmerkung: Die Vorhersage wird aus dem Bayes-Netzwerk für die Bewertung stärker gewichtet als der relative Vergleich im KeratinoSens™ allein, da eine integrierte Datenbewertung im Bayes-Netzwerk erfolgt.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan war Teil der durchgeführten Testreihe im KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

Testvorschlag: Die Prüfung des 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan innerhalb der Reihentestung der Härter im h-CLAT wäre zu begrüßen.

7.1.6.5 3-Aminopropyltriethoxysilan, CASRN 919-30-2

→ ausreichend Tierdaten → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>-In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine Informationen zur Sensibilisierung beim Menschen vor.

Es liegen verschiedene Versuche mit Meerschweinchen vor (1 x Bühler Test, 2 x GPMT). Die Ergebnisse in den Studien waren negativ bzw. maximal schwach positiv und deuten demnach in Richtung GMS. Allerdings sind die Versuche welche die Substanz in wässrigem Milieu prüfen ggfs. nicht aussagekräftig für die Substanz, da es zur Hydrolyse kommt und so nur die Hydrolyseprodukte getestet werden. Letztlich könnte man jedoch argumentieren, dass unter Anwendungsbedingungen der Epoxidharzsysteme durch Schweiß ebenfalls ein wässriges Milieu an den Kontaktstellen zu erwarten ist und demnach die Tests doch eine gewisse Relevanz bekommen.

Anhand der Informationen zum $\log K_{O/W}$ (0,31 bzw. 1,7) und dem $\log K_P$ (-3,84 bzw. -2,92) aus der EpiSuite™ und dem Registrierungsdossier kann die Bioverfügbarkeit abgeschätzt werden. Insgesamt wird diese als gut bewertet.

In silico Ergebnisse liegen nur in Bezug auf die Proteinreaktivität vor. In TOXTREE wird für den Inhaltsstoff, genau wie für die anderen Inhaltsstoffe mit Aminfunktion, die Schiffbasenbildung als Proteinreaktionsmechanismus vorhergesagt. Die QSAR Toolbox findet, dass wiederum nicht der Inhaltsstoff selbst, sondern ein Metabolit proteinreaktiv ist und es sich somit auch im Fall von 3-Aminopropyltriethoxysilan um ein Pro-Hapten handelt.

Die QSAR Toolbox Vorhersage in Bezug auf Peptidreaktivität gegenüber Lysin und Cystein, besagt wiederum keine Reaktivität für den Inhaltsstoff selbst und auch die Metaboliten scheinen keine Reaktivität gegenüber den Cystein- bzw. Lysinpeptiden zu zeigen. Dies bestätigt zudem das negative Ergebnis aus der Reihentestung im KeratinoSens™ für das strukturell am nächsten verwandte N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan (CASRN 1760-24-3).

Fazit: Auf Basis der verfügbaren Tierdaten und der vergleichenden *in vitro* Bewertung erfolgt eine Zuordnung in die Kategorie GMS.

Anmerkung: Die Priorität diesen Stoff in eine Reihentestung im vorliegenden Projekt aufzunehmen ist niedrig, da Informationen vorliegen, dass der Inhaltsstoff nur in geringen Konzentrationen in Epoxidharzsystemen verwendet wird (< 1 %).

7.1.6.6 Oligomerisierter Härter: 4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin, Synonym: IPD-POLYMER DBC-15-01, CASRN 38294-64-3

→ nur 1 <i>in vivo</i> Test → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
5. T-Zellreaktion	–	–	
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	Metabolit	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine Informationen zur Sensibilisierung beim Menschen vor.

Im Projekt wurde ein LLNA mit dem Inhaltsstoff durchgeführt, das Testergebnis weist in Richtung der Kategorie GMS (EC3 > 10 %).

Anhand der Informationen zum $\log K_{O/W}$ (6,64 bzw. 3,6) und dem $\log K_p$ (-2,14 bzw. -4,15) aus der EpiSuiteTM und dem Registrierungsdossier kann die Bioverfügbarkeit abgeschätzt werden. Insgesamt wird diese noch als gut bewertet.

Der oligomerisierte Härter war Teil der Reihentestung im KeratinoSensTM. Der Inhaltsstoff liefert neben neun anderen von insgesamt 16 getesteten Härtern ein negatives Ergebnis und dementsprechend wird dem oligomerisierten Härter im Vergleich zu den positiv getesteten Inhaltsstoffen eine geringere Reaktivität unterstellt (möglicher Hinweis GMS).

Es liegen keine weiteren Daten vor. Auch *in silico* Analysen konnten nicht erfolgen, da keine eindeutigen Struktur zugeordnet werden konnte.

Fazit: Auf Basis der wenigen verfügbaren Daten erfolgt zunächst die Zuordnung in die Kategorie U (Default HS). Allerdings wird auf Basis der neu generierten Daten der Hinweise GMS vergeben.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): Der oligomerisierte Härter war Teil der durchgeführten Testreihe im LLNA und KeratinoSensTM (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

Anmerkung: Das Testmaterial ist ein technisches Produkt³² und enthält als solches einen hohen Anteil an freiem Amin (IPD 5-10 %).

7.1.6.7 Formaldehyd, Polymer mit Benzenamin, hydriert, CASRN 135108-88-2

		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		–	–
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	–	–
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	–	–
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine Informationen zur Sensibilisierung beim Menschen oder aus Tierversuchen vor. Im Registrierungsossier sind keine Daten zur Sensibilisierung enthalten, es wurde ein Übertrag (read-across) zu 4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM, CASRN 1761-71-3; U→GMS) durchgeführt. Informationen über die Validität der Datenübertragung sind nicht zugänglich und können dementsprechend nicht geprüft werden.

Im vorliegenden Registrierungsossier wird die Substanz als UVCB charakterisiert, eine eindeutige Struktur (SMILES) kann demnach nicht zugeordnet werden. Die CAS-Nummer ist nicht in der EPISUITE enthalten, deswegen auch keine Modellierung möglich. Es kann keine Aussage zur Bioverfügbarkeit gemacht werden. Im vorliegenden Registrierungsossier ist kein mittleres Molekulargewicht genannt.

Auch Modellierungen zur Proteinreaktivität fehlen. Als funktionelle Gruppen im Molekül sind hauptsächlich Amingruppen enthalten, in diesem Sinne ist wahrscheinlich eine mögliche Proteinreaktivität wie bei den restlichen Aminen nicht direkt sondern erst nach metabolischer Aktivierung möglich. Der Mechanismus der Reaktivität ist ggfs. ebenso wie bei den anderen Aminen die Schiff Basen Bildung.

Fazit: Weil keine substanzspezifischen Daten vorhanden sind erfolgt eine Zuordnung in die Kategorie U. Somit wird dem Inhaltsstoff defaultmäßig eine hohe Sensibilisierungsstärke unterstellt.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (STOT RE 2 (kidney oral) (liver and skeleton), H373).

³² Zusammensetzung des IPD-Polymer DBC-15-01: BzOH ca. 50 %, Rest-IPD ca. 5 - 10 %, Addukt ca. 38 - 44 %; mittleres Molekulargewicht ca. 1200 – 2000 Dalton, Viskosität ca. 4000 mPas (25°C); H-Eq: 225

7.1.6.8 Polyethylenpolytriethylentetramin, Amine, N-C12-18-alkyltrimethylendi-, diacetate, CASRN 90640-46-3

		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		–	–
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	–	–
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	–	–
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine Daten zum Inhaltsstoff vor und auf Basis der fehlenden Struktur konnten ebenfalls keine QSAR Modellierungen durchgeführt werden.

Fazit: Weil keine Daten vorhanden sind erfolgt eine Zuordnung in die Kategorie U. Somit wird dem Inhaltsstoff defaultmäßig eine hohe Sensibilisierungsstärke unterstellt.

7.1.7 Säureanhydride

7.1.7.1 Phthalsäureanhydrid, CASRN 85-44-9

→ ausreichend Tierdaten → mehrere <i>in vitro</i> Tests		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Nein
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Ja (ARE)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Nein
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	Acylierung	Nein
	Molcode (LLNA)	Ja	Ja (schwach)

Berichte über Sensibilisierungen, die sich klinisch an der Haut manifestieren sind selten, dementsprechend erlauben die vorliegenden Humandaten keine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke.

Als Tierdaten liegen aus dem Vorläuferprojekt Versuche an Meerschweinchen (2 x GPMT, 1 x ein Nicht-Adjuvans Test) und Tests an Mäusen (LLNA) vor. Die erzielten Testergebnisse sind stark positiv (Kategorie HS und teilweise formale Prüfung SHS angemerkt). Mittlerweile ist

ein weiterer GPMT verfügbar der ebenfalls in Richtung HS weist. Ein weiteres Tierexperiment (MEST) mit positivem Testergebnis liegt vor, dieser Test kann jedoch nicht quantitative ausgewertet werden, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen

Im Vorläuferprojekt lagen bereits verschiedene *in vitro* Tests vor. Mittlerweile wurde zusätzlich eine Vielzahl an weiteren *in vitro* Tests mit dem Phthalsäureanhydrid durchgeführt. Es liegen Tests zur Proteinreaktivität, zur Aktivierung von Keratinozyten und zur Reifung von dendritischen Zellen vor. Meist kann jedoch keine quantitative Auswertung erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen und die Dateninterpretation dieser *in vitro* Tests bedarf eines tiefgreifenden mechanistischen Verständnisses.

Im DPRA und verwandten Tests wird deutlich, dass das Phthalsäureanhydrid gegenüber Lysin eine hohe Reaktivität aufweist, wohingegen die Reaktivität gegenüber Cystein sehr gering ausgeprägt ist. Dementsprechend sind negative Ergebnisse beispielsweise im ARE-Test, dem KeratinoSens™ oder dem LuSens Test, bei denen ein Marker der nach Modifikation eines Cysteins im Nrf2 Protein aktiv wird als Ausleseparameter genutzt wird, nicht unerwartet und stellen keinen Widerspruch zur stark sensibilisierenden Wirkstärke dar (Gerberick et al., 2008; Ramirez et al., 2014).

Bis auf einen Test (MUSST) zeigen ebenfalls alle Tests, die die Aktivierung dendritischer Zellen untersuchen (U-SENS, h-CLAT), ein negatives Ergebnis. Laut den Autoren des MUSST-Nachfolgetests – U-SENS – besitzt Phthalsäureanhydrid allerdings keines der bekannten Kriterien für ein falsch negatives Ergebnis. Bei diesem Inhaltsstoff kommt es bei Kontakt mit Wasser zu einer schnellen Hydrolyse (Halbwertszeit < 1 min bei 25 °C). Diese Hydrolyse findet im wässrigen Milieu des zellbasierten *in vitro* Tests statt, jedoch nicht bei der epikutanen Auftragung im LLNA und kann somit das unterschiedliche Testergebnis in den unterschiedlichen Testtypen erklären (Piroird et al., 2015).

Dies erklärt dann ebenso warum der Test basierend auf einem 3D-Hautmodell ein positives Ergebnis erzielt.

Das einzige quantitativ auswertbare *in vitro* Ergebnis liefert die Gensignaturanalyse in Keratinozyten gemäß SENS-IS. Die Kriterien für einen positiven Test sind bereits bei einer Testkonzentration von 1 % erfüllt und liefern somit einen Hinweis auf die Kategorie HS.

Die *in silico* Vorhersage mittels iSENS liefert EC3 Werte zwischen 12-21 %. Die Autoren bemerken bereits die Unterschätzung der vorhergesagten Ergebnisse im Vergleich mit den experimentell erzielten Daten (*in vitro* Eingangsparameter (h-CLAT, SH-Test, ARE-Test), charakterisieren ungenügend die Reaktivität gegenüber Lysin). Wird das künstliche neuronale Netzwerk (ANN), um die Struktur charakterisierende *in silico* Parameter erweitert, wird ein EC3 Wert von 0,77 % vorhergesagt. Dieser Wert ist in Übereinstimmung mit den Tierdaten und Zeit in Richtung HS (mit formaler Prüfung der Kategorie SHS).

Das Phthalsäureanhydrid war einer der Inhaltsstoffe dessen Wirkstärke in Bayes-Netzwerk von Jaworska und Kollegen untersucht wurde und die Vorhersage als starker Hinweis gekennzeichnet war. Die ermittelte Wirkstärkekategorie innerhalb des Systems war „pEC3 category.3“ (moderate Wirkstärke) und der vorhergesagt EC3 Wert lag bei 3,9 %. Dieser Wert deutet in Richtung HS.

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie HS (Basis Tierdaten und Hinweise aus *in vitro* Daten) wird beibehalten. Diese Einordnung wird gestützt durch neue *in vitro* (SENS-

IS) und *in silico* Analysen (iSENS, Bayes-Netzwerk). Ebenso der Zusatz, dass bei Vorlage neuer Daten eine Einordnung in die Kategorie SHS zu prüfen bleibt.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (H334 (R42): Atemwegssensibilisierung). Die Atemwegssensibilisierung ausgelöst durch zyklische Anhydride ist eine IgE vermittelte Immunantwort (Reaktion vom Sofort Typ oder Typ I, allergische Rhinitis; HCN, 2010).

Testvorschlag: Für eine verbesserte Relativbewertung *in vitro* Reihentestung aller Säureanhydride im optimierten DPRA und im h-CLAT (Anmerkung: kann eventuell entfallen, da mittlerweile viele Tests vorhanden; ggfs. wichtig als Referenzsubstanz). Eventuell zusätzlich Durchführung des NCTC2544 IL-18 Tests.

7.1.7.2 Tetrahydrophthalsäureanhydrid, CASRN 85-43-8

		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	Acylierung	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine neuen Daten vor.

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie HS (Basis Übertrag Phthalsäureanhydrid, gestützt durch das stark positive Ergebnis im vorliegenden GPMT) wird beibehalten.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (H334 (R42): Atemwegssensibilisierung). Die Atemwegssensibilisierung ausgelöst durch zyklische Anhydride ist eine IgE vermittelte Immunantwort (Reaktion vom Sofort Typ oder Typ I, allergische Rhinitis; HCN, 2010).

Anmerkung: Die Bewertung des Tetrahydrophthalsäureanhydrids war nur möglich durch die Verwendung der Daten des strukturell sehr ähnlichen Phthalsäureanhydrids. Sollte für diese Substanz eine Veränderung der Zuordnung vorgenommen werden, ist es vernünftig, dies für Tetrahydrophthalsäureanhydrid ebenfalls in Betracht zu ziehen.

Testvorschlag: Für eine verbesserte Relativbewertung *in vitro* Reihentestung aller Säureanhydride im optimierten DPRA und im h-CLAT. Eventuell zusätzlich Durchführung des NCTC2544 IL-18 Tests.

7.1.7.3 Hexahydrophthalsäureanhydrid, CASRN 85-42-7

→ nur 2 <i>in vivo</i> Tests → <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 2 Tests)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Nein (relativ)
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Nein (relativ)
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	Acylierung	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Die vorliegenden Humandaten erlauben keine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke. Als Tierdaten liegen aus dem Vorläuferprojekt ein Test an Meerschweinchen (GPMT) und ein Test an Mäusen (LLNA) vor. Die erzielten Testergebnisse sind stark positiv (Kategorie HS, im LLNA formale Prüfung SHS angemerkt). Es liegen keine neuen Tierdaten vor. Jedoch wurde mittlerweile einige *in vitro* Tests mit dem Hexahydrophthalsäureanhydrid durchgeführt.

Eine Untersuchung der Proteinreaktivität im DPRA zeigt, ebenso wie für das Phthalsäureanhydrid, eine höhere Reaktivität gegenüber Lysin als gegenüber Cystein. Dies liefert wiederum die mechanistische Erklärung für das negative Ergebnis im KeratinoSens™ (siehe 7.1.7.1). Vergleicht man das im MUSST erzielte numerische Ergebnis mit dem Ergebnis für das verwandte Phthalsäureanhydrid, so findet man eine Reaktivität in gleicher Höhe. Es kann allerdings keine quantitative Auswertung erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen.

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie HS (Basis Tierdaten und Übertrag Phthalsäureanhydrid) wird beibehalten. Diese Zuordnung wird durch die Ergebnisse der substanzspezifischen *in vitro* Tests gestützt.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (H334 (R42): Atemwegssensibilisierung). Die Atemwegssensibilisierung ausgelöst durch zyklische Anhydride ist eine IgE vermittelte Immunantwort (Reaktion vom Sofort Typ oder Typ I, allergische Rhinitis; HCN, 2010).

Anmerkung: Die Bewertung des Hexahydrophthalsäureanhydrids war nur möglich durch die Verwendung der Daten des strukturell sehr ähnlichen Phthalsäureanhydrids. Sollte für diese Substanz eine Veränderung der Zuordnung vorgenommen werden, ist es vernünftig, dies für Hexahydrophthalsäureanhydrid ebenfalls in Betracht zu ziehen.

Testvorschlag: Für eine verbesserte Relativbewertung *in vitro* Reihentestung aller Säureanhydride im optimierten DPRA und im h-CLAT. Eventuell zusätzlich Durchführung des NCTC2544 IL-18 Tests.

7.1.7.4 Methyltetrahydrophthalsäureanhydrid, CASRN 11070-44-3

		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		–	–
<i>-In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	Acylierung	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine neuen Daten vor.

Fazit: Die im Vorgängerprojekt durchgeführte Zuordnung in die Kategorie U (Default HS) bleibt bestehen.

Anmerkung: Eine Datenübertragung wie im Fall von Tetrathydrophthalsäureanhydrid (CASRN 85-43-8) wird für Methyltetrahydrophthalsäureanhydrid nicht durch Daten gestützt. Die vergleichbaren Ergebnisse erzielt in der *in silico* Analyse von Jaworska aus dem vorliegenden Projekt liefert für alle Phthalsäureanhydride die „pEC3 category.3“ (moderate Wirkstärke) und vorhergesagte EC3 Werte im Bereich von 2,9 – 3,9 %. Diese Werte deuten alle in Richtung HS. Allerdings sind die Vorhersagen, bis auf die für das Phthalsäureanhydrid (CASRN 85-44-9, siehe 7.1.7.1) selbst, eben nur als sehr schwache Hinweise zu werten und deswegen hier zunächst regulatorisch nicht angewandt.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (H334 (R42): Atemwegssensibilisierung). Die Atemwegssensibilisierung ausgelöst durch zyklische Anhydride ist eine IgE vermittelte Immunantwort (Reaktion vom Sofort Typ oder Typ I, allergische Rhinitis HCN, 2010).

Testvorschlag: Für eine verbesserte Relativbewertung *in vitro* Reihentestung aller Säureanhydride im optimierten DPRA und im h-CLAT. Eventuell zusätzlich Durchführung des NCTC2544 IL-18 Tests.

7.1.7.5 Methylhexahydrophthalsäureanhydrid, CASRN 25550-51-0

		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		–	–
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	Acylierung	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Die vorliegenden Humandaten erlauben keine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke. Umfängliche neue Daten lassen den Schluss zu, dass Sensibilisierungen gegen Methylhexahydrophthalsäureanhydrid selten sind.

Es liegen keine weiteren neuen Daten vor.

Fazit: Die im Vorgängerprojekt durchgeführte Zuordnung in die Kategorie U (Default HS) bleibt bestehen.

Anmerkung: Eine Datenübertragung wie im Fall von Tetrathydrophthalsäureanhydrid (CASRN 85-43-8) wird für Methylhexahydrophthalsäureanhydrid nicht durch Daten gestützt. Die vergleichbaren Ergebnisse erzielt in der *in silico* Analyse von Jaworska aus dem vorliegenden Projekt liefert für alle Phthalsäureanhydride die „pEC3 category.3“ (moderate Wirkstärke) und vorhergesagte EC3 Werte im Bereich von 2,9 – 3,9 %. Diese Werte deuten alle in Richtung HS. Allerdings sind die Vorhersagen, bis auf die für das Phthalsäureanhydrid (CASRN 85-44-9, siehe 7.1.7.1) selbst, eben nur als sehr schwache Hinweise zu werten und deswegen hier zunächst regulatorisch nicht angewandt.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (H334 (R42): Atemwegssensibilisierung). Die Atemwegssensibilisierung ausgelöst durch zyklische Anhydride ist eine IgE vermittelte Immunantwort (Reaktion vom Sofort Typ oder Typ I, allergische Rhinitis; HCN, 2010).

Testvorschlag: Für eine verbesserte Relativbewertung *in vitro* Reihentestung aller Säureanhydride im optimierten DPRA und im h-CLAT. Eventuell zusätzlich Durchführung des NCTC2544 IL-18 Tests.

7.1.8 Sekundäre und tertiäre Amine

7.1.8.1 3-((6-Aminotrimethylhexyl)amino)propionitril; N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin, CASRN 93941-62-9

→ kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		–	–
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine Human- oder Tierdaten vor.

Die Bioverfügbarkeit wird als gut und im Vergleich zu den anderen Härtern als mittelmäßig bewertet.

N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin liefert als einer von sechs der insgesamt 16 geprüften Härtern ein positives Ergebnis im KeratinoSens™ (als Teil der Reihentestung im vorliegenden Projekt). Es kann keine quantitative Auswertung für diesen *in vitro* Test erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen. Strukturell ist dieser Inhaltsstoff vielleicht noch am ehesten mit den aliphatischen Aminen verwandt. Der relative Vergleich der Ergebnisse zeigt für den Inhaltsstoff einen ähnlich EC_{1,5} Wert wie für Dipropylentriamin (CASRN 56-18-8) und EDA (CASRN 107-15-3). Im Vergleich zu den stark positiven cyloaliphatischen Aminen IPD (CASRN 2855-13-2) und AEP (CASRN 140-31-8), wird dementsprechend von einer relativ niedrigeren Reaktivität ausgegangen.

Fazit: Auf Basis der weiterhin dürftigen Datenverfügbarkeit bleibt die Zuordnung in die Kategorie U (Default HS) bestehen.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): N-cyanethyliertes TMD war Teil der durchgeführten Testreihe im KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

Testvorschlag: Die Prüfung des N-cyanethylierten TMDs innerhalb der Reihentestung der Härter im h-CLAT wäre zu begrüßen.

7.1.8.2 N,N-Dimethyl-cyclohexanamin, CASRN 98-94-2

→ ausreichend Tierdaten → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	–	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	Metabolit	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine Informationen zur Sensibilisierung beim Menschen vor.

Im Registrierungsossier sind drei Tierversuche zur Untersuchung der hautsensibilisierenden Eigenschaften des Inhaltsstoffes aufgeführt. Die Ergebnisse aus einem Nicht-Standard Meerschweinchen Test, einem Test nach Bühler und einem LLNA weisen deutlich in Richtung der Kategorie GMS (LLNE negativ, Bühler: negativ; Nicht-Standard Test: 15 % der Tiere mit positiven Hautreaktionen bei 1 %iger intradermaler Induktionsdosis ohne Adjuvans-Gabe).

Anhand der Informationen zum $\log K_{O/W}$ (2,31 bzw. 2,01) und dem $\log K_P$ (-1,99 bzw. -2,18) aus der EpiSuiteTM und dem Registrierungsossier kann die Bioverfügbarkeit abgeschätzt werden. Die Werte für den $\log K_{O/W}$ liegen im Bereich der maximalen Absorption, die Werte des $\log K_P$ lassen ebenfalls eine gute Bioverfügbarkeit erwarten.

In silico Ergebnisse liegen nur in Bezug auf die Proteinreaktivität vor. Weder in TOXTREE noch in der QSAR Toolbox wird für den Inhaltsstoff eine Proteinreaktivität vorhergesagt. Die gefundenen Metaboliten weisen ebenfalls keine Proteinreaktivität auf. Die QSAR Toolbox Vorhersage in Bezug auf Peptidreaktivität gegenüber Lysin und Cystein, besagt ebenfalls keine Reaktivität für den Inhaltsstoff selbst. Ein Metabolit reagiert jedoch mit Cystein und Lysin (jeweils „moderate“).

N,N-Dimethyl-cyclohexanamin war einer der Inhaltsstoffe dessen Wirkstärke in Bayes-Netzwerk von Jaworska und Kollegen untersucht wurde und die Vorhersage als starker Hinweis gekennzeichnet war. Die ermittelte Wirkstärkekategorie innerhalb des Systems war „pEC3 category.1“ (nicht sensibilisierend, berechneter EC3 Wert 101 %). Wie oben ersichtlich liegen für diesen Inhaltsstoff keine *in vitro* Daten vor und dementsprechend ist die Vorhersage für den Inhaltsstoff stark von den abgefragten strukturellen Merkmalen, sowie der integrierten Vorhersage aus dem Expertensystem TIMES (siehe FP-0324, Teilprojekt 5.1, Abschnitt 1.4.5 TIMES-SS) abhängig. Da die Plattform TIMES nicht frei verfügbar ist können die Hintergründe nicht weiter überprüft werden.

Fazit: Auf Basis der verfügbaren Tierdaten erfolgt die Zuordnung in die Kategorie GMS (zusätzlich Hinweis aus Bayes-Netzwerk, jedoch TIMES-SS nicht prüfbar).

7.1.9 Phenole

7.1.9.1 tert-Butylphenol, CASRN 98-54-4

→ nur 1 <i>in vivo</i> Test → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Wenig	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	–	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration&Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	–	–
	Molcode (LLNA)	–	–

Die Humanbefunde aus dem Vorläuferprojekt erlauben keine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke von tert-Butylphenol, deuten jedoch daraufhin, dass der Inhaltsstoff eher ein seltenes Allergen ist. Im Tierversuch zeigt sich ein negatives Versuchsergebnis (1 x GPMT). Es liegen keine neueren Informationen vor.

tert-Butylphenol war einer der Inhaltsstoffe dessen Wirkstärke in Bayes-Netzwerk von Jaworska und Kollegen untersucht wurde und die Vorhersage als starker Hinweis gekennzeichnet war. Die ermittelte Wirkstärkekategorie innerhalb des Systems war „pEC3 category.1“ (nicht sensibilisierend, berechneter EC3 Wert 101 %). Wie oben ersichtlich liegen für diesen Inhaltsstoff keine *in vitro* Daten vor und dementsprechend ist die Vorhersage für den Inhaltsstoff stark von den abgefragten strukturellen Merkmalen, sowie der integrierten Vorhersage aus dem Expertensystem TIMES (siehe FP-0324, Teilprojekt 5.1, Abschnitt 1.4.5 TIMES-SS) abhängig. Da die Plattform TIMES nicht frei verfügbar ist können die Hintergründe nicht weiter überprüft werden.

In silico Systeme sagen für tert-Butylphenol keine Proteinreaktivität vorher und es wurden keine proteinreaktiven Metabolite identifiziert.

Fazit: Die bestehende Zuordnung in die Kategorie GMS (Basis: Übertrag von Bisphenol A human seltenes Allergen, im Tierversuch negativ, *in silico* keine Proteinreaktivität vorhergesagt) bleibt bestehen.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (H361f: Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen).

Anmerkung: Eine Information aus dem 2. Begleitkreistreffen besagt, dass die Substanz seit dem 1.1.2016 wegen der reprotoxischen Effekte nicht mehr vermarktet wird.

7.1.9.2 Bisphenol A, CASRN 80-05-7

→ nur 2 <i>in vivo</i> Tests → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 2 Tests)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	–	–
	Molcode (LLNA)	–	–

Auf Basis der Humanbefunde kann die sensibilisierende Wirkstärke von Bisphenol A nicht bewertet werden. Neuere Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass es sich eher um ein seltenes Allergen handelt. Die aus dem Vorläuferprojekt bekannten tierexperimentellen Daten weisen auf eine geringe sensibilisierende Wirkung von Bisphenol A (1 x LLNA und 1 x GPMT, jeweils negatives Ergebnis). Weiterhin sind keine neueren Daten verfügbar.

Bisphenol A war einer der Inhaltsstoffe dessen Wirkstärke in Bayes-Netzwerk von Jaworska und Kollegen untersucht wurde und die Vorhersage als starker Hinweis gekennzeichnet war. Die ermittelte Wirkstärkekategorie innerhalb des Systems war „pEC3 category.1“ (nicht sensibilisierend, berechneter EC3 Wert 101 %). Wie oben ersichtlich liegen für diesen Inhaltsstoff keine *in vitro* Daten vor und dementsprechend ist die Vorhersage für den Inhaltsstoff stark von den abgefragten strukturellen Merkmalen, sowie der integrierten Vorhersage aus dem Expertensystem TIMES (siehe FP-0324, Teilprojekt 5.1, Abschnitt 1.4.5 TIMES-SS) abhängig. Da die Plattform TIMES nicht frei verfügbar ist können die Hintergründe nicht weiter überprüft werden.

Fazit: Die bestehende Zuordnung in die Kategorie GMS (Basis: Übertrag von tert-Butylphenol, human seltenes Allergen, im Tierversuch negativ, keine Proteinreaktivität vorhergesagt) bleibt bestehen.

Anmerkung: Es besteht eine Kreuzreaktivität zwischen dem chemisch eng verwandten Diethylstilbestrol und Bisphenol A.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (R62: Fortpflanzungsfähigkeit möglicherweise beeinflusst).

Der Inhaltsstoff kommt in Härtern vor, könnte aber auch als Restmonomer in den Harzen enthalten sein. Dazu liegen aber keine Informationen vor (persönliche Kommunikation mit Dr. Kersting, BG Bau). Die Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke rückt auf dem Hintergrund der bekannten endokrinen Wirkung von Bisphenol A in den Hintergrund, eine Testung dieser Eigenschaft dementsprechend ebenfalls. Bei der Verwendung von DGEBA Harzen ist die Verunreinigung durch größere Mengen an Bisphenol A auszuschließen.

7.1.9.3 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (tri-DMP), CASRN 90-72-2

→ nur 1 <i>in vivo</i> Test → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	SB	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Eine Bewertung der Wirkstärke war durch die Humanbefunde zu tri-DMP nicht möglich. Auf Basis der neuen Daten wird tri-DMP als zweithäufigstes Allergen unter den Härtern bzw. Beschleunigern für Epoxidharzsysteme identifiziert. Bei tri-DMP handelt es sich somit um ein „häufiges“ Allergen.

Weiterhin war der Inhaltsstoff Teil der Reihentestung im KeratinoSens™ und liefert neben neun anderen von insgesamt 16 getesteten Härtern ein negatives Ergebnis. Es kann keine quantitative Auswertung für diesen *in vitro* Test erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen. Im relativen Vergleich mit den stark positiven cycloaliphatischen Aminen IPD (CASRN 2855-13-2) und AEP (CASRN 140-31-8) wird dem Inhaltsstoff dementsprechend eine geringere Reaktivität unterstellt (möglicher Hinweis GMS).

Fazit: Auf Basis der nur wenigen verfügbaren Daten bleibt die Zuordnung in die Kategorie U zunächst bestehen (Default HS). Es erfolgt ein erster Hinweis auf die Kategorie GMS (U (→ GMS)) auf Basis des vorhandenen Tierversuchs und dem negativen Ergebnis im KeratinoSens™.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): tri-DMP war Teil der durchgeführten Testreihe im KeratinoSens™ (siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.10) aufgenommen.

Testvorschlag: Die Prüfung des tri-DMPs innerhalb der Reihentestung der Härter im h-CLAT wäre zu begrüßen.

7.1.9.4 Bis[(dimethylamino)methyl]phenol, CASRN 71074-89-0

→ kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		–	–
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	Metabolit	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine Informationen zur Sensibilisierung beim Menschen oder tierexperimentelle Daten vor.

Anhand der Informationen zum $\log K_{O/W}$ (1,02) und dem $\log K_p$ (-3,3) aus der EpiSuite™ kann die Bioverfügbarkeit abgeschätzt werden. Insgesamt wird diese als gut bewertet. Bis auf diese Abschätzung der Bioverfügbarkeit sind auch keine weiteren *in vitro* Daten vorhanden.

In TOXTREE wurde bezüglich der Proteinreaktivität des Inhaltsstoffes die Schiff Basenbildung als Mechanismus identifiziert. In der QSAR Toolbox wurde keine Proteinreaktivität gefunden. Der Skin metabolism simulator konnte 7 mögliche Metaboliten identifizieren, einer davon wurde als Proteinreaktiv nach dem Schiff Basen Mechanismus identifiziert

Fazit: Weil kaum Daten vorhanden sind erfolgt eine Zuordnung in die Kategorie U. Somit wird dem Inhaltsstoff defaultmäßig eine hohe Sensibilisierungsstärke unterstellt.

7.1.10 Härter: Zusammenfassung und relative Bewertung

In FP-0324 wurden insgesamt 30 der zu bewertenden Inhaltsstoffe als Härter in Epoxidharzsystemen klassifiziert (n = 30). Durch die Erweiterung der Stoffliste im vorliegenden Projekt wurde nun insgesamt 38 Stoffe als Härter gekennzeichnet und hier beurteilt (n = 38).

Untergruppen, z.B. aromatische Amine, aliphatische Amine etc. bleiben weiterhin bestehen. Neu hinzugekommen ist ein „vorgehärtetes“ Amin (siehe CASRN 38294-64-3), dieses ist jedoch unter der Rubrik „Härter, sonstige“ aufgeführt.

Die Datenlage im Vergleich um Vorgängerprojekt hat sich wesentlich verbessert (siehe Abbildung 14).

Die Verbesserung der Datenlage zeigt sich bei Dipropylentriamin (CASRN), Bis(4-(1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethylamino)-3-methylcyclohexyl)methane (CASRN 136210-32-7), 1,2-Diaminocyclohexan (DCH) (CASRN 694-83-7), m-Xylylendiamin/Acrylonitril Adduct (CASRN 73050-11-0), N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan (CASRN 1760-24-3), Hexahydrophthalsäureanhydrid (CASRN 85-42-7) und natürlich den neu im Projekt vorliegenden Stoffen.

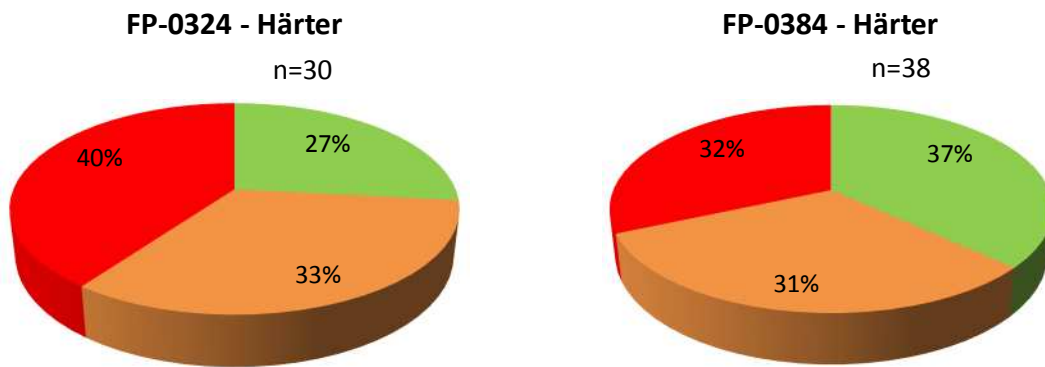


Abbildung 14 Datenlage der Härter im Vorläuferprojekt FP-0324 und im Projekt FP-0384

Die verbesserte Datenlage ist einerseits auf die neu verfügbaren Daten aus REACH-Registrierungen mit Abgabefrist 2013³³ und andererseits auf die im vorliegenden Projekt durchgeführten *in vitro* Testungen zurückzuführen.

Auf Basis der verbesserten Datenlage konnten insgesamt mehr Inhaltsstoffe einer eindeutigen Bewertung zugeführt werden. Für andere ergab sich zumindest eine Tendenzaussage (starker Hinweis auf eine bestimmte Wirkstärkekategorie, gekennzeichnet mit U → Kategorie; siehe Abbildung 15) oder immerhin ein erster Hinweis auf eine bestimmte sensibilisierende Wirkstärkekategorie (schwacher Hinweis, Datenlage weniger eindeutig als bei Tendenzaussage, gekennzeichnet U (→ Kategorie)).

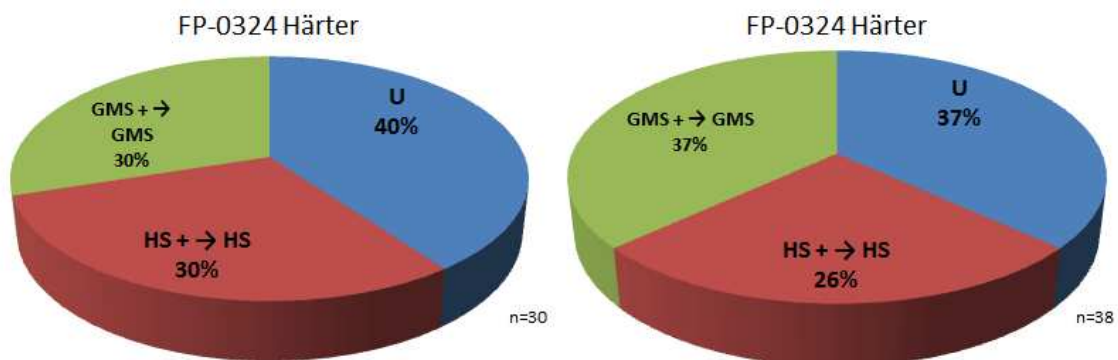


Abbildung 15 Ranking gemäß sensibilisierender Wirkstärke der Härter im Vorläuferprojekt FP-0324 und im Projekt FP-0384

³³ Neue Daten für Bis(4-(1,2-bis(ethoxycarbonyl)-ethylamino)-3-methylcyclo-hexyl)methan (136210-32-7), N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan (1760-24-3); trotz der avisierten REACH 2013 Registrierung lag für folgende Stoffe keine Registrierungsdossier vor (TETA (112-24-3), TEPA (112-57-2)) oder es waren keine relevanten Daten berichtet (DCH (694-83-7))

Für die vergleichende Bewertung wurden eindeutige Zuordnungen zu Wirkstärkekategorien und Tendenzaussagen für dieselbe Kategorie zusammengezählt. Während erste Hinweise weiterhin in der Kategorie U (unbekannt) enthalten blieben.

In FP-0324 waren jeweils neun Stoffe (30 %) in der Kategorie GMS (geringe oder mittlere Sensibilisierungsstärke) oder in der Kategorie HS (hohe Sensibilisierungsstärke). Die Kategorie GMS setzt sich aus sechs Substanzen die eindeutig eingeordnet waren und drei Substanz für die nur der Hinweis U → GMS vorlag zusammen. Im Fall der Kategorie HS lag in allen neun Fällen eine eindeutige Einordnung vor. 12 Inhaltsstoffe (40 %) konnten nicht bewertet werden und verblieben bis auf weiteres in der Kategorie U.

In FP-0384 wurden insgesamt acht zusätzliche Härter bewertet. Während sich die Anzahl der Inhaltsstoffe um zwei auf insgesamt 14 Stoffe erhöhte, verringerte sich somit der prozentuale Anteil der „U-Stoffe“ bei den Härtern leicht (37 %). Obwohl insgesamt 10 Inhaltsstoffe der Kategorie HS zugehören, also einer mehr als zuvor, sinkt der prozentuale Anteil auf 26 %. Die Anzahl der Stoffe in Kategorie GMS steigt auf 14 (37 %). Bei den insgesamt sechs neuen Zuordnungen um vier Tendenzaussagen (3 x U → GMS, 1 x U → HS) und zwei eindeutige Einordnungen (Kategorie GMS) handelt.

Insgesamt wurde somit:

- die Bewertung für 18 Härter bestätigt,
- für vier Härter wurde eine Tendenzaussage (U → Kategorie) getroffen
- für weiter vier Härter konnten erste Hinweise für eine Kategoriezuordnung gesammelt werden (schwächere Hinweise als bei Tendenzaussage, gekennzeichnet mit U (→ Kategorie)) und
- für zwei Inhaltsstoffe wurde eine endgültige Kategoriezuordnung möglich.

Für die Bewertung der noch nicht eingeordneten Härter wurde bereits im Vorläuferprojekt ein umfangreiches Testprogramm vorgeschlagen.

Es wurde vorgeschlagen, die aliphatischen Amine Dipropylentriamin, Trimethylhexamethyldiamin, Triethylentetramin, N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan sowie Tetra- und Pentaethylenhexamin, sowie Ethylendiamin und Diethylentriamin als Referenzsubstanzen im KeratinoSens™ sowie dem h-CLAT zu prüfen. Die Reihentestung sollte zudem auf die cycloaliphatischen Härter AEP und 3-Cyclohexylaminopropylamin ausgeweitet werden. Ebenfalls geprüft sollte tris-DMP und 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan, um den relativen Vergleich zu den aliphatischen Polyaminen herstellen zu können und auf Basis dieses Vergleichs möglicherweise zu einer Wirkstärkenbewertung für den letztgenannten Inhaltsstoff zu gelangen. Für einzelne Amine sind bereits Daten aus dem KeratinoSens™ (siehe EDA) oder dem h-CLAT vorhanden, die die Eignung dieser Systeme verdeutlichen, trotzdem sollte die Reihentestung alle genannten Amine umfassen, da ein Vergleich der Ergebnisse aus unterschiedlichen Laboren schwierig ist und leicht veränderte Versuchsbedingungen bereits einen großen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben können. Für Dipropylentriamin wurde zusätzlich ein *in vivo* Test vorgeschlagen (LLNA mit Vehikel Aceton/Olivenöl, zur Beseitigung der Unsicherheit aus den widersprüchlichen Tierdaten).

Im vorliegenden Projekt wurden weitere Stoffe in die Liste der zu testenden Härter aufgenommen, unter anderem der neu zu bewertende oligomerisierte Härter (CASRN 38294-64-3). Die Details zur Stoffauswahl können dem Kapitel 5.1 entnommen werden. Die

Prüfung von insgesamt 16 Härtern im KeratinoSens™ und vier Härtern in einem speziell angepassten reduzierten lokalen Lymphkонтentest an Mäusen wurde beauftragt.

Die in FP-0324 bereits vorgeschlagenen *in vitro* Tests (DPRA, h-CLAT, und ggfs. NCTC2544 IL-18) Tests für die verschiedenen Phthalsäureanhydride wurden nicht innerhalb dieses Projekts ausgeführt. Gründe hierfür waren a) das begrenzte Testbudget und b) die im Vergleich zu anderen Substanzen eher als gering eingeschätzte Relevanz. Zudem konnte auf Basis der Übertragung eine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke für einen Teil der Phthalsäureanhydride bereits durchgeführt werden. Die Durchführung dieser Tests wäre weiterhin zu befürworten, da zumindest eine verbesserte Relativbewertung durchgeführt werden könnte. Die Identifikation von Wirkstärkeunterschieden in Gruppen von technisch möglichen Ersatzstoffen ist das erklärte Hauptziel der Vorgängerstudie und dieser Studie.

Die Auswertung der im KeratinoSens™ erzielten Ergebnisse für die 16 getesteten Härter wird bereits sehr ausführlich in Kapitel 5.2.2 diskutiert. Wie dort bereits erwähnt ist es sinnvoll die Amine nochmals in Untergruppen zu unterteilen, um ggfs. mechanistische Unterschiede besser zu umgehen. Dies wurde bei den stoffspezifischen Bewertungen miteinbezogen und soll hier nicht weiter vertieft werden. Hier folgen nur einige spezielle Anmerkungen zu bestimmten Fragestellungen und generelle Schlussfolgerungen.

- Variabilität der erzielten Ergebnisse

Wenn man die Ergebnisse erzielt im gleichen Test, jedoch von unterschiedlichen Autoren oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt, betrachtet, sieht man immer wieder deutliche Unterschiede (z.B. N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan (CASRN 109-55-7) dieses Projekt und Ergebnisse aus (Natsch et al., 2013)). Wie bereits erwähnt, keines der vorhandenen Testsysteme (*in vivo*, *in vitro* und *in silico*) ist perfekt und eine gewisse biologische Varianz ist immer zu erwarten. Aus diesem Grund wird nochmals darauf verwiesen, dass ein relativer Vergleich, wie er im vorliegenden Projekt angewandt wurde, am besten mit Ergebnissen durchgeführt wurde, die im selben Experiment ermittelt wurden.

- Unterschiedliche Ergebnisse in ähnlichen Tests: z.B. h-CLAT und MUSST

Es kommt vor, dass für einen Inhaltsstoff im h-CLAT qualitativ ein positives Ergebnis erzielt wird, während im MUSST ein negatives Ergebnis gemessen wurde – theoretisch könnte sich dieser Unterscheid aus einer unterschiedlichen metabolischen Kapazität der unterschiedlichen Monozytenzelllinien (THP-1 (h-CLAT), U937 (MUSST)) ergeben (Beispiel N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan, CASRN 109-55-7).

- Auswirkung der *in silico* Analyse nach ITS-3

Anhand der *in vitro* Ergebnisse und von Strukturmerkmalen wurde, wie in Kapitel 6 besprochen, die Analyse im Bayes-Netzwerk nach Jaworska durchgeführt. Die starken Beweise (Bayes Faktor > 10) aus der ITS-3, die letztlich für die Wirkstärkenbewertung auch herangezogen wurden beziehen sich alle auf Härter. Sie sind in Kapitel 6, Tabelle 33 aufgelistet und werden spezifisch bei den jeweiligen Stoffen besprochen. In einem Fall, dem 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan (CASRN 2997-01-5) führt der Hinweis aus der ITS letztlich sogar zum ersten Hinweis in die Richtung der Kategorie GMS bei der Wirkstärkenbewertung gesamt.

- Widersprüchliche Datenbewertung bei strukturell verwandten Stoffen

Für die Stoffe 3-Aminopropyltriethoxysilan (CASRN 919-30-2) und N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan (CASRN 1760-24-3) liegen leicht widersprüchliche Bewertungen eines bestimmten Studientyps vor (jeweils GPMT in wässrigem Milieu mit negativem Ergebnis). Während bei 3-Aminopropyltriethoxysilan (CASRN 919-30-2) die negativen Ergebnisse, auf Basis der schnellen Hydrolyse im getesteten wässrigen Milieu, als nicht repräsentativ für die Ausgangssubstanz bewertet werden (OECD, 2003), wird ein solches tierexperimentelles Ergebnis als Bestätigung der Tendenzaussage in Richtung der Kategorie GMS (geringe bis mäßige sensibilisierende Wirkstärke) für das N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan (CASRN 1760-24-3) herangezogen. Die Wirkstärkenbewertung insgesamt beruht in beiden Fällen auf mehr als diesen Daten mit fraglicher Relevanz, dementsprechend ist die richtige Einordnung gesichert. Im vorliegenden Projekt wurden allerdings solche Widersprüche, wo vorhanden, berücksichtigt und wenn bewertungsrelevant stoffspezifisch diskutiert.

Insgesamt wird festgehalten, dass auf Basis der projektspezifischen Testungen und in Zusammenschau der LLNA und *in vitro* Ergebnisse:

- die Bewertung des IPD (CASRN 2855-13-2) bestätigt werden konnte und
- für drei weitere Härter eine Tendenzbewertung möglich wurde (Dipropylentriamin (CASRN 56-18-8), ipox EH 2240 (CASRN 90530-16-8/73050-11-0), IPD-POLYMER DBC-15-01 (CASRN 38294-64-3)).

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen bestätigen zudem noch die Einordnung weiterer bereits eindeutig eingeordneter Stoffe.

Anmerkung: Viele der Härter sind als hautreizend (R37/H315) oder sogar ätzend (R34/H314) eingestuft. Diesem Umstand wurde bereits bei der Auswertung der zu den jeweiligen Inhaltsstoffen vorhandenen Tierdaten Rechnung getragen und soll nochmals zu einem späteren Zeitpunkt im Projektverlauf (Abschätzung der Auswirkung der Applikationsmenge auf die Sensibilisierungswirkung) thematisiert werden.

7.1.11 Reaktivverdünner

7.1.11.1 Butyl-glycidylether (Butyl-GE; BGE), CASRN 2426-08-6

→ Tierdaten → vergleichende <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Ja (relativ)
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Ja (ARE, relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Nein
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	Ja	Ja (schwach)

Im Human-Maximierungstest wird Butylglycidylether (BGE) als starkes Allergen gewertet. Allergische Reaktionen auf Butylglycidylether werden bei Patienten mit Verdacht auf Epoxidharz-Allergie mäßig häufig beobachtet. Dies liegt allerdings eher an der geringen Verbreitung der Substanz in Epoxidharzsystem.

Als Tierdaten liegen aus dem Vorläuferprojekt ein Versuch an Meerschweinchen (GPMT) und zwei Versuche an Mäusen (LLNA) vor. Die Ergebnisse aller Versuche weist auf die Kategorie GMS hin³⁴. Ein neue durchgeführter rLLNA findet einen EC3 Wert von 31 % und deutet somit ebenfalls in Richtung der Kategorie GMS.

Verschiedene *in vitro* Versuche zur Proteinreaktivität, zur Aktivierung der Keratinozyten und zur Reifung dendritischer Zellen liegen bereits aus dem Vorläuferprojekt vor. Weitere Versuche in dieser Richtung wurden veröffentlicht. Es kann jedoch keine quantitative Auswertung für diese *in vitro* Test erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen.

Das einzige quantitativ auswertbare *in vitro* Ergebnis liefert die Gensignaturanalyse in Keratinozyten gemäß SENS-IS. Die Kriterien für einen positiven Test sind bereits bei einer Testkonzentration von 1 % erfüllt und liefern somit einen Hinweis auf die Kategorie HS. Die Autoren erkennen die Diskrepanz mit den tierexperimentellen Daten, geben jedoch keine weitere Erklärung.

BGE war Teil der im Projekt durchgeführten Reihentestung im DPRA und KeratinoSens™ (Referenzsubstanz). Im DPRA zeigte der Inhaltsstoff im Vergleich zu anderen Glycidylethern eine geringere Reaktivität und dementsprechend wird die sensibilisierende Reaktivität als geringer bewertet. Im KeratinoSens™ zeigen sich im Vergleich zu dem als stark sensibilisierend eingeordneten Phenyl-GE (CASRN 122-60-1) höhere EC2 und EC3 Werte und dementsprechend wird von einer geringeren Aktivierung der Keratinozyten ausgegangen.

³⁴ Ggfs. Unterschätzung der sensibilisierenden Wirkstärke im LLNA, da BGE sehr stark flüchtig und innerhalb von 30 min weg von der Applikationsstelle (findet sich auch in der Bewertung von Basketter et al., 2014)

Die *in silico* Vorhersage mittels iSENS liefert EC3 Werte zwischen 4,3-5,5 %. Die Autoren bemerken bereits die Überschätzung der vorhergesagten Ergebnisse im Vergleich mit den experimentell erzielten Daten (*in vitro* Eingangsparameter (h-CLAT, SH-Test, ARE-Test)). Wird das künstliche neuronale Netzwerk (ANN), um die Struktur charakterisierende *in silico* Parameter erweitert, wird ein EC3 Wert von 18 % vorhergesagt. Dieser Wert ist in Übereinstimmung mit den Tierdaten und zeigt in Richtung GMS.

Fazit: Die bereits bestehende Zuordnung in die Kategorie GMS wird beibehalten (Basis: vorhandenen Tierdaten, den zusätzlichen relativen *in vitro* Ergebnissen und den *in silico* Einschätzungen). Allerdings besteht eine gewisse Unsicherheit – eindeutig ist die geringere Reaktivität im Vergleich zu dem Phenyl-GE.

Anmerkung: Eine Kreuzreaktivität zwischen BGE und den chemisch verwandten C12/C14-Monoglycidylethern (d.h. Epoxid Nr.8) und Kresylglycidylethern wurde beobachtet. Möglicherweise kann es immunologische Kreuzreaktionen (via Metabolisierung) bei primärer Sensibilisierung gegen 1,4-BDDGE geben.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (R40: Verdacht krebserzeugende Wirkung; R68: Irreversible Schäden möglich).

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0324 und FP-0384): BGE wurde als Referenzsubstanz in verschiedene Testungen mitaufgenommen (DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT; siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.12) aufgenommen.

7.1.11.2 1,4-Butandiol-diglycidylether (BDDGE), CASRN 2425-79-8

→ ausreichend Tierdaten → <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Nein (relativ)
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Ja (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Ja (relativ)
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	Ja	Ja (schwach)

BDDGE ist ein häufiges Allergen unter den Reaktivverdünnern. Die aus dem Vorläuferprojekt bekannten Tierexperimente liefern teilweise widersprüchliche Daten, die Mehrheit der relevanten Tests deutet jedoch auf die Kategorie HS hin.

BDDGE wurde im Vorläuferprojekt im KeratinoSens™ und h-CLAT überprüft und jeweils positive Testergebnisse erzielt (KeratinoSens™: LLNA EC3 Wert Vorhersage 2,3 %; h-CLAT: relativ sehr stark). BDDGE war Teil der im Projekt durchgeführten Reihentestung im DPRA (Referenzsubstanz). Im DPRA zeigte der Inhaltsstoff im Vergleich zu anderen Glycidylethern eine stärkere Reaktivität und dementsprechend wird dem Inhaltsstoff ggfs. eine höhere

Wirkstärke unterstellt. Es kann jedoch keine quantitative Auswertung für diese *in vitro* Tests erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen.

Fazit: Die bereits bestehende Zuordnung in die Kategorie HS wird beibehalten (Basis verfügbare Human- und Tierdaten). Die mittlerweile große Anzahl an *in vitro* Tests bestätigt zudem die Zuordnung in eine Kategorie mit höherer Wirkstärke.

Anmerkung: Eine Kreuzreaktivität zwischen BDDGE und dem chemisch eng verwandten 1,6-Hexandiol-diglycidylether ist beschrieben.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0324 und FP-0384): BDDGE wurde als Referenzsubstanz in verschiedene Testungen mitaufgenommen (DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT; siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.12) aufgenommen.

7.1.11.3 Neopentylglykol-diglycidylether (Neopentylglykol-DGE), CASRN 17557-23-2

→ nur 1 <i>in vivo</i> Test → <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Nein (relativ)
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Ja (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Ja (relativ)
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Die vorhandenen Humanbefunde zu Neopentylglykol-DGE erlauben keine Beurteilung der sensibilisierenden Wirkstärke. Aus dem Vorläuferprojekt ist ein Test an Meerschweinchen bekannt. Das Ergebnis (87 % der verwendeten Tiere bei einer 5 %igen Induktionsdosis eine positive Hautreaktion) führt zu einer Einordnung in die Kategorie GMS. Allerdings kann aus formalen Gründen unabhängig vom Testergebnis keine Einordnung in die Kategorie HS erfolgen, da eine intradermale Induktionsdosis von > 1 % verwendet wurde.

Neopentylglykol-DGE wurde im Vorläuferprojekt im KeratinoSens™ und h-CLAT überprüft und jeweils positive Testergebnisse erzielt. Relativ war der Inhaltsstoff dabei im h-CLAT weniger stark wirksam als die eng verwandten Diglycidylether (HDDGE und BDDGE). Und auch im KeratinoSens™ weist Neopentylglykol-DGE einen höheren EC1,5 (und EC4,5) Wert auf und wird dementsprechend als weniger reaktiv erachtet. Die damals durchgeführte Umwandlung in eine Vorhersage eines EC3 Wert aus dem LLNA liefert den Wert von 1,87 % und demnach einen Hinweis auf die Kategorie HS. Neopentylglykol-DGE war Teil der im Projekt durchgeführten Reihentestung im DPRA. Im DPRA zeigte der Inhaltsstoff im Vergleich zu anderen Glycidylethern eine stärkere Reaktivität, der numerische Wert liegt im Bereich der eng verwandten Diglycidylether (HDDGE und BDDGE). Es kann jedoch keine quantitative Auswertung für diese *in vitro* Tests erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen.

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie U wird zunächst beibehalten. Als Default-Vorgehen wird für den so zu bewertenden Inhaltsstoff in unserem Ansatz eine hohe Sensibilisierungsstärke unterstellt. Allerdings erfolgt auf Basis des relativen Vergleichs der *in vitro* Daten die Tendenzaussage in Richtung HS.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0324 und FP-0384): Neopentylglykol-DGE wurde in verschiedene Testungen mitaufgenommen (DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT; siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.12) aufgenommen.

Anmerkung: Neopentylglykol-DGE ist strukturell mit BDDGE und HDDGE verwandt. Sollte für diese Substanzen eine Veränderung der Einstufung vorgenommen werden, ist es vernünftig, dies für Neopentylglykol-DGE ebenfalls in Betracht zu ziehen.

Hinweis: Aus dem relativen Vergleich wird deutlich, dass sich potentielle Wirkstärkenunterschiede zwischen Neopentylglykol-DGE und den stärker sensibilisierenden HDDGE und BDDGE nicht in der relativ groben Wirkstärkenbewertung widerspiegeln.

7.1.11.4 2-Ethylhexyl-glycidylether (2-Ethylhexyl-GE), CASRN 2461-15-6

→ nur 1 <i>in vivo</i> Test → <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Nein (relativ)
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Nein (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Für den Inhaltsstoff liegen keine Humanbefunde vor. Im mittlerweile verfügbaren Registrierungsossier findet sich eine tierexperimentelle Studie. Das Ergebnis dieses Adjuvans Tests („Maurer Optimisation Test“) führt zur Einordnung in die Kategorie HS³⁵.

2-Ethylhexyl-GE war Teil der im Projekt durchgeführten Reihentestung im DPRA und KeratinoSens™. Im DPRA zeigte der Inhaltsstoff im Vergleich zu anderen Glycidylethern eine geringere Reaktivität (noch unter BGE) und dementsprechend wird die sensibilisierende Reaktivität hier als geringer bewertet. Im KeratinoSens™ zeigen sich im Vergleich zu dem als stark sensibilisierend eingeordneten Phenyl-GE (CASRN 122-60-1) etwas höhere EC1,5, EC2 und EC3 Werte und dementsprechend wird von einer etwas geringeren Aktivierung der Keratinozyten ausgegangen, allerdings immer noch stärker als bei BGE. Es kann jedoch keine quantitative Auswertung für diese *in vitro* Tests erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen.

Fazit: Die frühere Zuordnung in die Kategorie U (Default HS) kann noch nicht aufgehoben werden, es erfolgt eine Tendenzaussage in Richtung HS. Dies basiert auf dem vorhandenen Ergebnis aus einer Tierstudie und der Einordnung der Keratinozytenreaktivität. Die im DPRA identifizierte geringe Peptiddepletion ist nicht ausreichend, um dieser Einordnung entgegenzustehen.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0384): 2-Ethylhexyl-GE wurde in verschiedene Testungen mitaufgenommen (DPRA, KeratinoSens™, siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.12) aufgenommen.

Hinweis: Aus dem relativen Vergleich wird deutlich, dass sich potentielle Wirkstärkenunterschiede zwischen 2-Ethylhexyl-GE und beispielsweise den stärker sensibilisierenden PGE und Kresyl-GE nicht in der relativ groben Wirkstärkenbewertung widerspiegeln.

³⁵ Überschätzung der sensibilisierenden Wirkstärke bei Adjuvans-Tests immer ggfs. möglich.

7.1.11.5 1,6-Hexandiol-diglycidylether (HDDGE), CASRN 16096-31-4

→ nur 2 <i>in vivo</i> Tests → <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		ja	Ja (nur 2 Tests)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Nein (relativ)
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Ja (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Ja (relativ)
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

1,6-Hexandioldiglycidylether ist ein häufiges Allergen unter den Reaktivverdünnern. Die aus dem Vorläuferprojekt bekannten Tierexperimente (1 x LLNA, 1 x Adjuvans Test („Maurer Optimisation Test“)) liefern Ergebnisse, die zur Einordnung in die Kategorie HS führen.

HDDGE wurde im Vorläuferprojekt im KeratinoSens™ und h-CLAT überprüft und jeweils positive Testergebnisse erzielt (KeratinoSens™: LLNA EC3 Wert Vorhersage 0,9 %; h-CLAT: relativ sehr stark). HDDGE war Teil der im Projekt durchgeführten Reihentestung im DPRA. Im DPRA zeigte der Inhaltsstoff im Vergleich zu anderen Glycidylethern eine stärkere Reaktivität und dementsprechend wird dem Inhaltsstoff ggfs. eine höhere Wirkstärke unterstellt. Der numerisch ermittelte Wert liegt im Bereich der chemisch eng verwandten Diglycidylether (Neopentylglykol-DGE und BDDGE). Es kann jedoch keine quantitative Auswertung für diese *in vitro* Tests erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen.

Fazit: Die bereits bestehende Zuordnung in die Kategorie HS wird beibehalten (Basis LLNA (unsicher) und andere Daten deutlich Tendenzen in Richtung der Kategorie HS; nach *in vitro* Tests in FP-0324 nach Relativvergleich zu BDDGE eindeutig) und wird durch weitere *in vitro* Testungen bestätigt.

Anmerkung: Eine Kreuzreaktivität zwischen HDDGE und dem chemisch eng verwandten 1,4-Butandiol-diglycidylether ist beschrieben.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0324 und FP-0384): HDDGE wurde in verschiedene Testungen mitaufgenommen (DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT; siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.12) aufgenommen.

7.1.11.6 Versaticsäure-glycidylester (z.B. Cadura E 10) 2,3-epoxypropyl-neodecanoat, CASRN 26761-45-5

→ ausreichend Tierdaten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Wenig	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Die vorliegenden Humandaten erlauben keine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke. Umfängliche neue Daten lassen den Schluss zu, dass Sensibilisierungen gegen Versaticsäureglycidylester selten sind.

Es liegen keine weiteren neuen Daten vor.

Fazit: Die im Vorgängerprojekt durchgeführte Zuordnung in die Kategorie GMS bleibt bestehen (Zuordnung, obwohl Humanbefunde nicht quantitativ verwertbar sind, nur eine Spezies im Tierversuch untersucht und nur einige *in vitro* Untersuchungen vorliegen; Basis; Wissen, dass im GPMT erzielte Ergebnisse, die Wirkstärke der geprüften Substanz eher über- als unterschätzen und relativer Vergleich mit anderen Monoglycidylethern (Details siehe Heine et al., 2012).

7.1.11.7 Trimethylolpropan-Triglycidylether (Trimethylolpropan-TGE), CASRN 30499-70-8

→ nur 2 <i>in vivo</i> Tests → <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Wenig	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 2 Tests)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Nein (relativ)
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Ja (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Ja (relativ)
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Die vorliegenden Humanbefunde erlauben keine Beurteilung der sensibilisierenden Wirkstärke von Trimethylolpropan-TGE. Der Inhaltsstoff ist kaum verbreitet in Epoxidharz-Systemen für das Baugewerbe stellt ein seltenes Allergen unter den Reaktivverdünnern dar.

Ein Versuch an Mäusen (Standard LLNA) liefert einen EC3 Wert von 1,4 % und weist somit auf eine Einordnung in die Kategorie HS (berichtet mit CASRN 3454-29-3). Zudem liegt noch ein Testergebnis aus einem nicht radioaktiven Test an Mäusen (LNCC) vor, für den noch keine cut-off Werte für eine quantitative Auswertung zur Verfügung stehen (EC1,5 = 1,7 %).

Im mittlerweile verfügbaren Registrierungs-dossier findet sich eine weiter tierexperimentelle Studie. In diesem Adjuvans Tests („Maurer Optimisation Test“) wird ein negatives Testergebnis identifiziert.

Trimethylolpropan-TGE wurde im Vorläuferprojekt im KeratinoSens™ und h-CLAT überprüft und jeweils positive Testergebnisse erzielt (KeratinoSens™: LLNA EC3 Wert Vorhersage 0,58 %; h-CLAT: relativ sehr stark). Trimethylolpropan-TGE war Teil der im Projekt durchgeführten Reihentestung im DPRA. Im DPRA zeigte der Inhaltsstoff im Vergleich zu anderen Glycidylethern eine stärkere Reaktivität (allerdings mit größerer Unsicherheit als beispielsweise die Ergebnisse für BDDGE und HDDGE). Dementsprechend wird dem Inhaltsstoff ggfs. eine höhere Wirkstärke unterstellt. Es kann jedoch keine quantitative Auswertung für diese *in vitro* Tests erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen.

Fazit: Die bereits im Vorgängerprojekt bestehenden Hinweise auf eine Zuordnung in die Kategorie HS, können durch weitere Daten (Tierdaten (LLNA) und DPRA) gestützt werden. Ein Widerspruch stellt noch der Adjuvans-Test dar, das negative Ergebnis wird aber der Mehrheit der Daten untergeordnet.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (Skin Corrs. 1C, H314; Eye Damage 1, H318; Muta 2, H341).

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0324 und FP-0384): Trimethylolpropan-triglycidylether wurde in die Testreihe (DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT; siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.12) aufgenommen.

7.1.11.8 C12/C14-Monoglycidylether, C12/C14-Alkylglycidylether (C12/C14-Mono-GE), CASRN 68609-97-2

→ Tierdaten → <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (Biov. gering)
	2. Haptenisierung	Ja	Nein (relativ)–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Ja (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Nein
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

C12/C14-Monoglycidylether ist ein weit verbreiteter Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen in EPOX 2002 sind jedoch keine allergischen Reaktionen aufgetreten.

Die Ergebnisse der tierexperimentellen Daten aus dem Vorläuferprojekt sind teilweise widersprüchlich (3 x GPMT, jeweils GMS (aber formal keine Einordnung in HS möglich da in allen drei Untersuchungen eine intradermale Induktionsdosis von > 1 % gewählt wurde), 2 x Bühler Test – einmal HS und einmal negatives Testergebnis (GMS), 2 x LLNA – einmal HS und einmal negatives Testergebnis (GMS, allerdings Studiendesign nicht völlig korrekt – nicht bis zur reizenden Konzentration getestet))³⁶. Zudem liegt mittlerweile ein Testergebnis aus einem nicht radioaktiven Test an Mäusen (LNCC) vor, für den noch keine cut-off Werte für eine quantitative Auswertung zur Verfügung stehen (EC1,5 = 0,7 %, Aceton).

C12/C14-Mono-GE wurde im Vorläuferprojekt im KeratinoSens™ und h-CLAT überprüft. Im KeratinoSens™ wurde ein positive Testergebnisse erzielt (LLNA EC3 Wert Vorhersage 0,4 %). Dieses eher unerwartete Ergebnis wird wahrscheinlich durch die stark zytotoxische Reaktion des C12/C14-Mono-GE verursacht und korreliert womöglich nicht mit der sensibilisierenden Wirkstärke. Im h-CLAT fand sich keine Induktion der Reifung untersuchter Monozyten (negativ – geringe Wirkstärke). C12/C14-Mono-GE war Teil der im Projekt durchgeführten Reihentestung im DPRA. Im DPRA zeigte der Inhaltsstoff im Vergleich zu anderen Glycidylethern eine sehr geringe Reaktivität (allerdings mit größerer Unsicherheit als beispielsweise die Ergebnisse für BGE und Polypropylenglykol-DGE). Dementsprechend wird dem Inhaltsstoff relativ eine niedrigere Wirkstärke unterstellt als beispielsweise für den als stark sensibilisierend eingeordneten PGE. Es kann jedoch keine quantitative Auswertung für diese *in vitro* Tests erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen.

Fazit: Auf Basis der widersprüchlichen Daten erfolgt eine Zuordnung in die Kategorie U. Dem Default-Vorgehen entsprechend, wird dem so bewerteten Inhaltsstoff in unserem Ansatz eine hohe Sensibilisierungsstärke unterstellt. Trotz der Widersprüche wird auf Basis der Humandaten und der vergleichenden *in vitro* Bewertung eine Tendenzaussage in Richtung GMS getroffen.

Anmerkung: In einem Versuch (GPMT) werden nach Induktion durch C12/C14-Monoglycidylether ebenfalls positive Reaktionen bei Verwendung von Butyl-glycidylether, Kresylglycidylether oder einem nicht näher spezifizierten Epoxidharz, als auslösendem Agens, beobachtet (Hinweis auf Kreuzreaktivität).

Testvorschlag: Zur Klärung der Widersprüche sollten C12/C14-Monoglycidylether in die *in vitro* Reihentestung anderen Mono-, Di- und Triglycidylethern im optimierten DPRA (Peptidreaktivität/ Haptenisierung) und dem KeratinoSens™ aufgenommen werden. Es ist davon auszugehen, dass durch den relativen Vergleich und auf Basis der verfügbaren Zuordnung der Sensibilisierungsstärke von Butyl-glycidylether und Phenyl-glycidylether eine Einordnung der C12/C14-Monoglycidylether möglich wird.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0324 und FP-0384): C12/C14-Monoglycidylether wurde in die Testreihe (DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT; siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.12) aufgenommen (Klärung der widersprüchlichen Tierdaten DPRA - relativen Vergleich

³⁶ Testung teilweise mit Gemischen durchgeführt, deren Reinheit nicht näher angegeben ist (Hauptbestandteil C12/C14-Mono-GE). Allerdings durchaus möglich, dass hier Verunreinigungen eine wesentliche Rolle gespielt haben.

und auf Basis der verfügbaren Zuordnung der Sensibilisierungsstärke von Butyl-glycidylether und Phenyl-glycidylether).

7.1.11.9 Polypropylenglykol-diglycidylether/Polyoxypropylen-diglycidylether, CASRN 26142-30-3

→ keine <i>in vivo</i> Daten → <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		–	–
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	–	–
	2. Haptenisierung	Ja	Ja (relativ)
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Ja (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Ja (relativ)
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	–	–
	Molcode (LLNA)	–	–

Humanbefunde oder Tierdaten liegen nicht vor.

Polypropylenglykol-DGE wurde im Vorläuferprojekt im KeratinoSens™ und h-CLAT überprüft. Im KeratinoSens™ wurde ein positive Testergebnisse erzielt (LLNA EC3 Wert Vorhersage 20,4 %). Im h-CLAT hingegen ein negatives Ergebnis (Hinweis GMS). Polypropylenglykol-DGE war Teil der im Projekt durchgeführten Reihentestung im DPRA. Im DPRA zeigte der Inhaltsstoff im Vergleich zu anderen Glycidylethern eine geringere Reaktivität und dementsprechend wird die sensibilisierende Reaktivität als geringer bewertet. Es kann jedoch keine quantitative Auswertung für diese *in vitro* Tests erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen.

Die Bewertung des Polypropylenglykol-DGE erfolgt gemeinsam mit dem Dipropylenglykol-DGE und Polypropyleneglykol-chlormethyloxiran-Polymer.

Fazit: Die Bewertung in die Kategorie GMS wird festgelegt (Basis geringere Biov. als beim Dipropylen-DGE angenommen (Polymer), Ergebnisse der *in vitro* Tests und generell geringere Wirkstärke von Polymeren).

Hinweis: Die Zuordnung in die Kategorie GMS hat nur Bestand unter der Voraussetzung, dass die Monomere im angewandten Epoxidharzsystem den allgemeinen Konzentrationsgrenzwert von 0,1 % nicht erreichen bzw. überschreiten. Falls dies doch der Fall sein sollte, ist die Bewertung des Monomers heranzuziehen.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0324 und FP-0384): Polypropylenglykol-DGE wurde in die Testreihe (DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT; siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.12) aufgenommen.

7.1.11.10 Polypropyleneglykol-chlormethyloxiran-Polymer, CASRN 9072-62-2

		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		–	–
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	-	-
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	-	–
	4. Migration & Reifung DCs	-	–
	5. T-Zellreaktion	-	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Umfängliche neue Daten lassen den Schluss zu, dass Sensibilisierungen gegenüber dem Polypropyleneglykol-chlormethyloxiran-Polymer selten sind. Es liegen keine Tierdaten vor.

Die Bewertung des Polypropyleneglykol-chlormethyloxiran-Polymer erfolgt gemeinsam mit dem Dipropylenglykol-DGE und Polypropylenglykol-DGE.

Fazit: Die Bewertung in die Kategorie GMS wird festgelegt (Basis geringere Biov. als beim Dipropylen-DGE angenommen (Polymer), Ergebnisse der *in vitro* Tests (Datenübertragung von Polypropylenglykol-DGE (CASRN 26142-30-3) und generell geringere Wirkstärke von Polymeren).

Hinweis: Die Zuordnung in die Kategorie GMS hat nur Bestand unter der Voraussetzung, dass die Monomere im angewandten Epoxidharzsystem den allgemeinen Konzentrationsgrenzwert von 0,1 % nicht erreichen bzw. überschreiten. Falls dies doch der Fall sein sollte, ist die Bewertung des Monomers heranzuziehen.

7.1.11.11 Dipropylenglykol-diglycidylether (DiPG-DGE), CASRN 41638-13-5

		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		–	–
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Humanbefunde oder Tierdaten liegen nicht vor.

Die Bioverfügbarkeit wurde als gut eingeschätzt, im Vergleich zu den anderen Reaktivverdünnern jedoch als eher gering.

Die Bewertung des Dipropylenglykol-DGE erfolgt gemeinsam mit dem Polypropyleneglykol-chlormethyloxiran-Polymer und Polypropylenglykol-DGE.

Fazit: Auf Basis der nur spärlich verfügbaren Daten erfolgt eine Zuordnung in die Kategorie U. Demzufolge wird dem Inhaltsstoff als Default in unserem Ansatz eine hohe Sensibilisierungsstärke unterstellt. Auf Basis des geringeren Molekulargewichts im Vergleich zu Polypropylenglykol-DGE werden keine Daten übertragen.

Anmerkung: Es gibt eine Reihe von Polypropylenglykol-diglycidylethern mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Den Niedermolekularen wird dabei eine sensibilisierende Wirkung unterstellt, wohingegen den Höhermolekularen (Grenze liegt bei ~ 500 Da, siehe FP-0324, Teilprojekt 5.1, Abschnitt Bioverfügbarkeit/ Hautdurchdringung) diese Eigenschaft eher fehlt (persönliche Kommunikation mit Dr. Rouw, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin). Dies spiegelt sich auch in den Testergebnissen der durchgeführten *in vitro* Tests mit dem Polypropylenglykol-DGE wider (negativ oder jeweils nur geringe Reaktivität im relativen Vergleich zu anderen Glycidylethern).

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0324 und FP-0384): Anstelle des Dipropylenglykol-DGE wurde der Polypropylenglykol-DGE (siehe oben) in die Testreihe (DPRA, KeratinoSens™ und h-CLAT) aufgenommen.

7.1.11.12 Cyclohexandimethanol-diglycidylether, CASRN 14228-73-0 /
Cyclohexandimethanol-divinylether CASRN 17351-75-6

Cyclohexandimethanol-DGE (CASRN 14228-73-0)

→ kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		–	–
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Ja (relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Nein
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Humanbefunde oder Tierdaten liegen nicht vor.

Es liegen keine neuen Daten vor.

Cyclohexandimethanol-DGE wurde im Vorläuferprojekt im KeratinoSens™ und h-CLAT überprüft. Im KeratinoSens™ wurde ein positive Testergebnisse erzielt (LLNA EC3 Wert Vorhersage 0,64 %). Im h-CLAT fand sich hingegen keine Induktion der Reifung untersuchter Monozyten (negativ – geringe Wirkstärke). Es kann keine quantitative Auswertung für diese *in vitro* Tests erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen.

Fazit: Die im Vorgängerprojekt durchgeführte Zuordnung in die Kategorie U (Default HS) bleibt bestehen (Basis zu wenige Daten).

Cyclohexandimethanol-divinylether (CASRN 17351-75-6)

→ nur 1 <i>in vivo</i> Tests → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Nein	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	Metabolit	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen keine Humanbefunde vor.

Aus dem Registrierungsossier steht mittlerweile ein GPMT zur Verfügung. Die nicht eindeutige Datendokumentation und studientechnische Einschränkungen (positives Testergebnis, aber keine formale Einordnung möglich da intradermale Induktionsdosis > 1 % (in diesem Fall 30 %)) lassen eine Wirkstärkenbewertung auf Basis dieses Tests jedoch nicht zu.

Fazit: Die im Vorgängerprojekt durchgeführte Zuordnung in die Kategorie U (Basis zu wenige Daten) bleibt bestehen. Als Default-Vorgehen wird für den so zu bewertenden Inhaltsstoff in unserem Ansatz eine hohe Sensibilisierungsstärke unterstellt.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0324 und FP-0384): Cyclohexandimethanol-divinylether wurde nicht für eine *in vitro* Testung berücksichtigt (keine Relevanz für Epoxidharzsysteme). Cyclohexandimethanol-DGE hingegen wurde in die Testreihe im Projekt FP-0324 berücksichtigt (KeratinoSens™, h-CLAT). Obwohl der DPRA ein geeignetes Testsystem für diesen Diglycidylether darstellt, wurde eine Testung in FP-0384 nicht durchgeführt, da das Testmaterial nicht rechtzeitig zur Verfügung gestellt werden konnte (Bestellung wäre über Sigma-Aldrich grundsätzlich aber möglich).

7.1.11.13 p-tert-Butylphenol-monoglycidylether, CASRN 3101-60-8

→ nur 2 <i>in vivo</i> Test → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Wenig	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 2 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Die relativ hohen Sensibilisierungsquoten sprechen vor allem vor dem Hintergrund der offenbar nicht besonders großen Verbreitung von p-tert-Butylphenylglycidylether dafür, dass es sich um ein eher starkes Allergen handelt.

Aus dem Vorläuferprojekt liegt ein Versuch an Mäusen vor (LLNA in Aceton), welcher eine Einordnung in die Kategorie HS nahelegt (EC3 = 0,4 %). Aus dem mittlerweile verfügbaren Registrierungsossier liegt zudem das Ergebnis eines zweiten LLNA (Aceton/Olivenöl) vor, dies weist ebenfalls in Richtung der Kategorie HS (EC3 = 6,9 %). Zudem liegt außerdem ein Testergebnis aus einem nicht radioaktiven Test an Mäusen (LNCC) vor, für den noch keine cut-off Werte für eine quantitative Auswertung zur Verfügung stehen (EC1,5 = 0,5 %, Aceton).

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie U (Basis zu wenige Daten) wird beibehalten (Default HS). Die leicht verbesserte Datenlage erlaubt jedoch die Tendenzaussage in Richtung HS.

Anmerkung: p-tert-Butylphenol-GE scheint eher ein eigenständiges Allergen zu sein.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0324 und FP-0384): Wie auch für andere Mono-, Di- und Triglycidylethern wurde für p-tert-Butylphenol-GE die Testung im DPRA und dem KeratinoSens™ vorgeschlagen (Eignung dieser Testsysteme für die Glycidylether durch Anwendung bei BGE, PGE und anderen Mono-, Di- und Triglycidylethern belegt). Aufgrund der Tatsache, dass jedoch kein Testmaterial zur Verfügung gestellt werden konnte, konnte dieser Inhaltsstoff für die Testung nicht berücksichtigt werden.

7.1.11.14 Phenyl-glycidylether (PGE), CASRN 122-60-1

→ ausreichend Tierdaten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Ja (nur relativ)
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Ja (nur relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Nein
5. T-Zellreaktion	–	–	
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Auf Basis aller Humanbefunde wird PGE als starkes Allergen eingeordnet. Dass trotz seiner aktuell geringen Verbreitung in Epoxidharzsystemen häufig allergische Reaktionen beobachtet werden, dürfte an immunologischen Kreuzreaktionen bei primärer Sensibilisierung gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA und/oder DGEBAF liegen.

Aus dem Vorläuferprojekt liegt eine Vielzahl an Tierversuchen vor, die eine Einordnung in die Kategorie HS nahelegen (1 x LLNA, 2 x Adjuvans Tests, 1 x nicht standardisierter Nicht Adjuvans, weitere Tests liegen vor, können aber aus unterschiedlichen Gründen nicht quantitativ ausgewertet werden). Es liegen keine neueren Tierdaten vor.

PGE wurde im Vorläuferprojekt bereits im KeratinoSens™ und h-CLAT überprüft. Im KeratinoSens™ wurde ein positive Testergebnisse erzielt (LLNA EC3 Wert Vorhersage 0,6 %; der erzielte EC1,5 Wert liegt in derselben Größenordnung, wie der im vorliegenden Projekt ermittelte Wert). Im h-CLAT fand sich keine Induktion der Reifung untersuchter Monozyten (negativ – geringe Wirkstärke).

PGE war auch Teil der im Projekt durchgeführten Reihentestung im DPRA und KeratinoSens™ (Referenzsubstanz). Im DPRA zeigte der Inhaltsstoff im Vergleich zu anderen Glycidylethern eine stärkere Reaktivität und dementsprechend wird dem Inhaltsstoff ggfs. eine höhere Wirkstärke unterstellt. Im KeratinoSens™ zeigen sich bei PGE zusammen mit dem o-Kresyl-GE (CASRN 2210-79-9) die niedrigsten EC1,5, EC2 und EC3 Werte und dementsprechend wird von einer stärkeren Aktivierung der Keratinozyten ausgegangen. Es kann jedoch keine quantitative Auswertung für diese *in vitro* Tests erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen.

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie HS (Basis Human- und Tierdaten) wird beibehalten. Die Einordnung wird zudem durch *in vitro* Ergebnisse gestützt (DPRA und KeratinoSens™). Ebenso der Zusatz, dass bei Vorlage neuer Daten eine Einordnung in die Kategorie SHS zu prüfen bleibt (Basis LLNA Ergebnis).

Anmerkung: Kreuzreaktionen mit verschiedenen Epoxidharzen auf Basis von Bisphenol A oder Bisphenol F, sowie anderen Phenylglycidylethern (z.B. p-tert.-Butylphenol-mono-glycidylether und Kresyl-GE) sind belegt. Allerdings lassen sich isolierte Fälle die nur gegen PGE sensibilisiert sind, nicht jedoch gegenüber DGEBA nicht gut erklären, da die Kreuz-

reaktivität ausschlaggebend sein sollte (siehe auch Humandaten bzw. zusammenfassende Information zu immunologischen Kreuzreaktionen, Kapitel 4 und **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (R45: Kann Krebs erzeugen; R68: Irreversible Schäden möglich).

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0324 und FP-0384): BGE wurde als Referenzsubstanz in verschiedene Testungen mitaufgenommen (DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT; siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.12) aufgenommen.

7.1.11.15 o-Kresyl-glycidylether (o-Kresyl-GE), 2,3-epoxypropyl-o-tolyl-ether, CASRN 2210-79-9

→ Tierdaten → <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	Ja	Ja (nur relativ)
	3. Keratinozytenreaktion	Ja	Ja (nur relativ)
	4. Migration & Reifung DCs	Ja	Nein
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen wenige Humandaten vor, die sich ausdrücklich auf den o-Kresyl-GE beziehen. Einige Fälle von Kontaktallergie gegen o-Kresyl-GE wurden beschrieben. Allergische Reaktionen auf Kresylglycidylether (Isomerengemisch) in Epoxidharzsystemen sind häufig beschrieben worden, meist mit gleichzeitiger Reaktion auf PGE. Sowohl o-Kresyl-GE als auch das Isomerengemisch des Kresyl-GE sind in Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe kaum verbreitet. Eine Beurteilung der sensibilisierenden Wirkstärke ist anhand der Daten nicht möglich.

Aus dem Vorläuferprojekt sind verschiedene Nicht-Adjuvans Tests an Meerschweinchen berichtet. Ein Test weist dabei auf eine hohe Sensibilisierungsstärke (Kategorie HS) des nicht weiter spezifizierten Kresylglycidylethers hin. Im anderen Test ist die Quantifizierung der sensibilisierenden Wirkstärke nicht möglich, da die zur Induktion verwendete Konzentration nicht genannt war. Es wurde jedoch eine stark positive Reaktion (100 %) gefunden. In beiden Untersuchungen wurde ein Gemisch aus Dowanol DPM und Tween® 80 als Vehikel verwendet. Aus dem mittlerweile verfügbaren Registrierungsdossier liegen zudem Ergebnisse aus Adjuvans Tests an Meerschweinchen vor. Obwohl in beiden Studien (jeweils GPMT in Vaseline) eine sehr starke Hautreaktion bei den meisten Tieren beobachtet wurde, kann eine Einordnung in die Kategorie HS aus formalen Gründen nicht stattfinden (Induktionsdosis > 1 %). Zusätzlich liegt aus dem vorliegenden Projekt das Testergebnis aus

einem Tierexperiment an Mäusen (LLNA) vor. Der ermittelte EC3 Wert von 1,6 % deutet in Richtung der Kategorie HS.

o-Kresyl-GE war auch Teil der im Projekt durchgeführten Reihentestung im DPRA und KeratinoSens™. Im DPRA zeigte der Inhaltsstoff im Vergleich zu anderen Glycidylethern eine stärkere Reaktivität (allerdings mit größerer Unsicherheit als beispielsweise die Ergebnisse für BDDGE und HDDGE). Dementsprechend wird dem Inhaltsstoff ggfs. eine höhere Wirkstärke unterstellt. Im KeratinoSens™ zeigen sich bei o-Kresyl-GE zusammen mit PGE (CASRN 122-60-1) die niedrigsten EC1,5, EC2 und EC3 Werte und dementsprechend wird von einer stärkeren Aktivierung der Keratinozyten ausgegangen. Es kann jedoch keine quantitative Auswertung für diese *in vitro* Tests erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen.

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie HS (Basis Übertrag von Daten zum Kresylglycidylether-Isomerengemisch und enge Strukturverwandtschaft zu PGE) bleibt bestehen und wird durch die zusätzlichen *in vivo* und *in vitro* Daten bestätigt.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (R68: Irreversible Schäden möglich; entspricht ebenso der harmonisierten Einstufung nach CLP). Allerdings wird diese harmonisierte Einstufung nicht im zur Verfügung stehenden Registrierungsossier übernommen. Eine finale Abschätzung steht aus.

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0324 und FP-0384): o-Kresyl-GE wurde als Referenzsubstanz in verschiedene Testungen mitaufgenommen (LLNA, DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT; siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.12) aufgenommen.

7.1.11.16 Kresyl-glycidylether, Isomerengemisch, CASRN 26447-14-3

→ nur 1 <i>in vivo</i> Test → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Die Bewertung erfolgt gemeinsam mit dem o-Kresyl-GE (CASRN 2210-79-9). Die Daten werden bereits in Abschnitt 7.1.11.15 referiert.

Fazit: Die bestehende Zuordnung zu Kategorie HS (Basis Tierdaten, enge Strukturverwandtschaft zu PGE) wird beibehalten und wird durch die zusätzlichen *in vivo* und *in vitro* Daten zum o-Kresyl-GE bestätigt.

Anmerkung: Kreuzreaktionen mit dem chemisch eng verwandten PGE sind beschrieben.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (R68: Irreversible Schäden möglich).

Projektbezogene *in vitro* Testung (FP-0324 und FP-0384): Der o-Kresyl-GE anstelle des Kresylglycidylether-Isomerenmischung wurde als Referenzsubstanz in verschiedene Testungen mitaufgenommen (DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT; siehe auch Kapitel 5 und Abschnitt 7.1.12) aufgenommen.

7.1.11.17 Propantriolglycidylether (1,2,3-Propanetriol, glycidyl ethers bzw. 1,2,3-Propanetriol, polymer with 2-(chloromethyl)oxirane), CASRN 90529-77-4 / 25038-04-4

→ nur 1 <i>in vivo</i> Test → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (geringe Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Es liegen zu wenige Humandaten zur Bewertung der sensibilisierenden Eigenschaften und Wirkstärke für den Inhaltsstoff vor.

Im Registrierungsossier zu CASRN 90529-77-4 wird ein Experiment an Mäusen (LLNA) berichtet. Ein EC3 Wert wurde nicht ausgewiesen, da der maximale Stimulationsindex 1,6 war und somit ein negatives Ergebnis erzielt wurde (Hinweis GMS).

Anhand der Informationen zum log K_{O/W} (-0,94 bzw. -1,99) und dem log K_p (-4,26 bzw. -5,55) kann die Bioverfügbarkeit abgeschätzt werden. Insgesamt wird diese gerade noch als gut bewertet, liegt aber im Vergleich mit den anderen Reaktivverdünnern im unteren Bewertungsbereich. Im Registrierungsossier zu CASRN 90529-77-4 wird ebenfalls von einer geringen Bioverfügbarkeit nach dermalen Exposition ausgegangen.

In silico Ergebnisse liegen nur in Bezug auf die Proteinreaktivität vor. In TOXTREE wird dem proteinreaktiven Inhaltsstoff, wie auch für die anderen Mono- und Diglycidylether, eine Wirkung über der S_N2 Mechanismus vorhergesagt. Die QSAR Toolbox Vorhersage in Bezug auf Peptidreaktivität gegenüber Lysin und Cystein, besagt eine moderate Reaktivität gegenüber Cystein- bzw. eine geringe Reaktivität gegenüber Lysin-haltigen Peptiden.

Fazit: Auf Basis der wenigen verfügbaren Daten erfolgt eine Zuordnung in die Kategorie U. Somit wird dem Inhaltsstoff defaultmäßig eine hohe Sensibilisierungsstärke unterstellt.

Anmerkung: die generell geringere Wirkstärke von Polymeren könnte man in Zusammenschau mit dem negativen Tierversuch als Hinweis auf eine geringe Wirkstärke für den

Inhaltsstoff werten. Eine solche Zuordnung in die Kategorie GMS hätte nur Bestand unter der Voraussetzung, dass die Monomere im angewandten Epoxidharzsystem den allgemeinen Konzentrationsgrenzwert von 0,1 % nicht erreichen bzw. überschreiten. Falls dies doch der Fall sein sollte, ist die Bewertung des Monomers heranzuziehen.

Hinweis: Der Inhaltsstoff ist bezüglich anderer Eigenschaften eingestuft, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (Muta 2, H341; Repro 2 H361 oder Resp. Sens 1, H334; STOT SE 3, H335).

7.1.11.18 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat,
CASRN 2386-87-0

→ nur 1 <i>in vivo</i> Test → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Insgesamt liegen nur wenige Informationen zur Sensibilisierung beim Menschen vor. Diese Daten reichen nicht aus, um eine abschließende Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke durchzuführen.

Beim einzigen vorhandenen Tierversuch handelt es sich um einen GPM Test. Aus formalen Gründen erfolgte eine Einordnung der erzielten Ergebnisse in die Kategorie GMS. Die Einstufung beruht auf dem gewählten Studiendesign. Durch die Verwendung einer intradermalen Induktionsdosis von > 1 % kann formal keine Einstufung in die Kategorie HS erfolgen. Im Test zeigten 63 % der verwendeten Tiere eine positive Hautreaktion.

Anhand der Informationen zum log K_{O/W} (2,37 bzw. 1,34) und dem log K_p (-2,65 bzw. -3,33) aus der EpiSuite™ und dem Registrierungsdossier kann die Bioverfügbarkeit abgeschätzt werden. Insgesamt wird diese als gut bewertet und liegt im Vergleich mit den anderen Reaktivverdünnern im mittleren Bewertungsbereich.

In silico Ergebnisse liegen nur in Bezug auf die Proteinreaktivität vor. In TOXTREE wird dem proteinreaktiven Inhaltsstoff, wie auch für die anderen Mono- und Diglycidylether, eine Wirkung über der S_N2 Mechanismus vorhergesagt. Die QSAR Toolbox Vorhersage in Bezug auf Peptidreaktivität gegenüber Lysin und Cystein, besagt eine moderate Reaktivität gegenüber Cystein- bzw. eine geringe Reaktivität gegenüber Lysin-haltigen Peptiden.

Fazit: Auf Basis der wenigen verfügbaren Daten erfolgt eine Zuordnung in die Kategorie U. Somit wird dem Inhaltsstoff defaultmäßig eine hohe Sensibilisierungsstärke unterstellt.

7.1.11.19 4,4'-Methylenbis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)anilin], 4,4'-Methylenebis(N,N-diglycidylanilin), TGMDA, CASRN 28768-32-3

→ nur 1 <i>in vivo</i> Test → kaum <i>in vitro</i> Daten		Vorhanden?	Quantifizierung möglich?
Humandaten (Schritt A)		Ja	Siehe IVDK Bericht
Tierdaten (Schritt B)		Ja	Ja (nur 1 Test)
<i>In vitro</i> (Schritt C)	Testbatterie		
	1. Bioverfügbarkeit	Ja	Nein (gute Biov.)
	2. Haptenisierung	–	–
	3. Keratinozytenreaktion	–	–
	4. Migration & Reifung DCs	–	–
	5. T-Zellreaktion	–	–
<i>In silico</i> (Schritt D)	Mechanistische Domäne	S _N 2	Nein
	Molcode (LLNA)	–	–

Insgesamt liegen jedoch nur wenige Informationen zur Sensibilisierung beim Menschen vor. Diese Daten reichen nicht aus, um eine abschließende Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke durchzuführen.

Der im Registrierungsdossier berichtete LLNA liefert keinen EC3 Wert für die Substanz. Allerdings ist bereits bei der niedrigsten getesteten Konzentration (10 % (w/w)) ein Stimulationsindex von 5,97 gemessen worden, dies entspricht einem positiven Ergebnis. Ein EC3 Wert würde unter der 10 % Grenze liegen und somit im Bereich der Kategorie HS. Eine finale Aussage, ob nicht auch die Kategorie SHS geprüft werden müsste, kann anhand der Testergebnisse nicht nachvollzogen werden.

Anhand der Informationen zum log K_{O/W} (2,53 bzw. 2,12) und dem log K_p (-3,49 bzw. -3,77) aus der EpiSuiteTM und dem Registrierungsdossier kann die Bioverfügbarkeit abgeschätzt werden. Insgesamt wird diese als gut bewertet. Der log K_{O/W} liegt im Bereich der maximalen Absorption und der log K_p liegt im Vergleich mit den anderen Reaktivverdünnern im mittleren Bewertungsbereich.

In silico Ergebnisse liegen nur in Bezug auf die Proteinreaktivität vor. In TOXTREE wird dem proteinreaktiven Inhaltsstoff, wie auch für die anderen Mono- und Diglycidylether, eine Wirkung über der S_N2 Mechanismus vorhergesagt. Die QSAR Toolbox Vorhersage in Bezug auf Peptidreaktivität gegenüber Lysin und Cystein, besagt eine moderate Reaktivität gegenüber Cystein- bzw. eine gering Reaktivität gegenüber Lysin-haltigen Peptiden.

Fazit: Auf Basis der wenigen verfügbaren Daten erfolgt eine Zuordnung in die Kategorie U. Somit wird dem Inhaltsstoff defaultmäßig eine hohe Sensibilisierungsstärke unterstellt.

Hinweis: Der Inhaltsstoff befand sich in der Substanzbewertung (ECHA, 2016b; for details see CORAP justification), die eindeutige Klärung der Substanzeigenschaften bezüglich anderer Eigenschaften, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind (Muta 2, H341) steht noch aus.

7.1.12 Reaktivverdünner: Zusammenfassung und relative Bewertung

Im Vorläuferprojekt wurde für 13 Reaktivverdünner eine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke vorgelegt. Drei ursprünglich einzeln aufgeführte Inhaltsstoffe wurden gemeinsam mit verwandten Inhaltsstoffen bewertet. Dies waren: Polypropylenglykol-DGE (CASRN 26142-30-3), Polypropylenglykol-chlormethyloxiranpolymer (CASRN 9072-62-2) und o-Kresylglycidylether (CASRN 2210-79-9). Für eine Ausführliche Begründung wird auf den Bericht zu FP-0324 verwiesen (Heine et al., 2012). Da sich beim Eintrag von Cyclohexandimethanol-DGE (CASRN 14228-73-0) und Cyclohexandimethanol-divinylether (CASRN 17351-75-6) um zwei unterschiedliche Inhaltsstoffe handelt wurden insgesamt 17 Bewertungen durchgeführt. Im aktuellen Projekt wurden drei zusätzliche Reaktivverdünner zur Substanzliste hinzugefügt. Die Anzahl der durchgeführten Bewertungen für Reaktivverdünner beläuft sich somit auf tatsächlich 20 Inhaltsstoffe.

Die Datenlage im Vergleich zum Vorläuferprojekt hat sich wesentlich verbessert (siehe Abbildung 16).

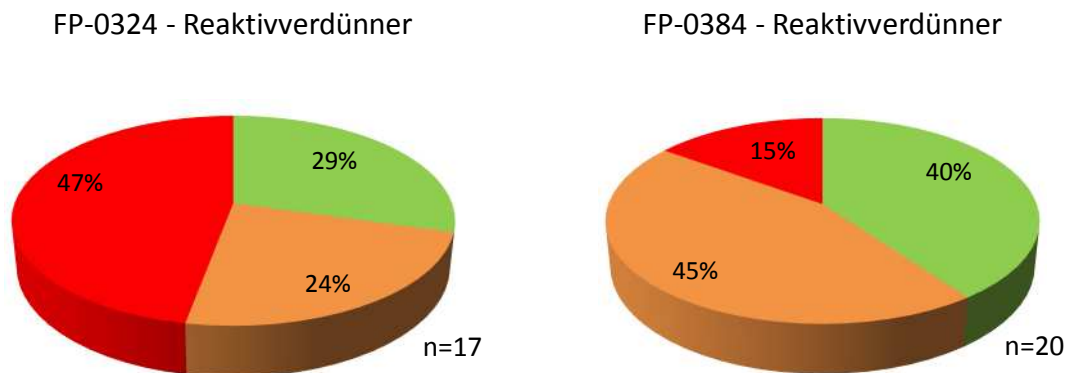


Abbildung 16 Datenlage der Reaktivverdünner im Vorläuferprojekt FP-0324 und im Projekt FP-0384

Die Verbesserung der Datenlage zeigt sich bei 2-Ethylhexyl-GE (CASRN 2461-15-6), Trimethylolpropan-TGE (CASRN 30499-70-8), C12/C14-Mono-GE (CASRN 68609-97-2), Polypropylenglykol-DGE (CASRN 26142-30-3), Cyclohexandimethanol-divinylether (CASRN 17351-75-6) und o-Kresyl-GE (CASRN 2210-79-9).

Die verbesserte Datenlage ist einerseits auf die neu verfügbaren Daten aus REACH-Registrierungen mit Abgabefrist 2013³⁷ und andererseits auf die im vorliegenden Projekt durchgeführten *in vitro* Testungen zurückzuführen.

Auf Basis der verbesserten Datenlage ergab sich für weitere, der zu überprüfenden Inhaltsstoffe, eine eindeutige Bewertung oder zumindest eine Tendenzaussage (starker Hinweis auf eine bestimmte Wirkstärkenkategorie, siehe Abbildung 17).

³⁷ Neue Daten für 2-Ethylhexyl-GE (CASRN 2461-15-6), Trimethylolpropan-TGE (CASRN 30499-70-8), Cyclohexandimethanol-divinylether (CASRN 17351-75-6), p-tert-Butylphenol-GE (CASRN 3101-60-8) und o-Kresyl-GE (CASRN 2210-79-9)

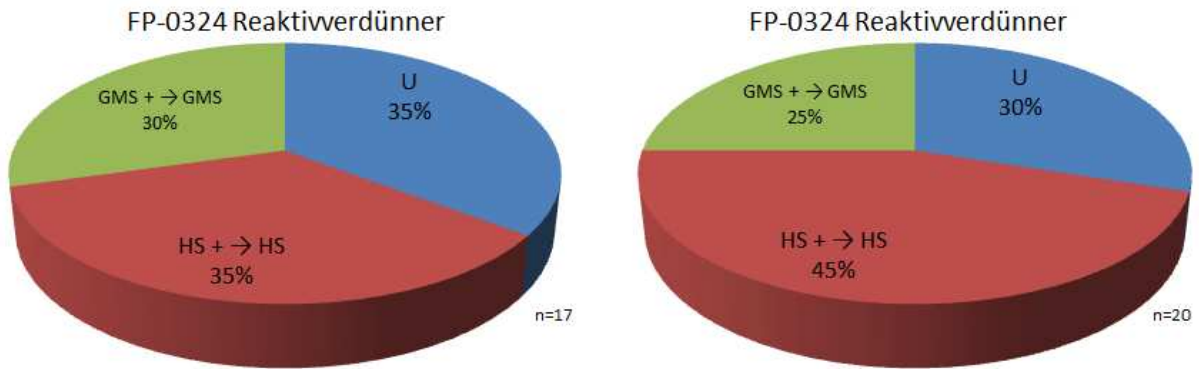


Abbildung 17 Ranking gemäß sensibilisierender Wirkstärke der Reaktivverdünner im Vorläuferprojekt FP-0324 und im Projekt FP-0384

Für die vergleichende Bewertung wurden eindeutige Zuordnungen zu Wirkstärkekategorien und Tendenzaussagen für dieselbe Kategorie zusammengezählt. Während erste Hinweise weiterhin in der Kategorie U (unbekannt) enthalten blieben.

In FP-0324 waren jeweils sechs Stoffe (35 %) in der Kategorie U oder in der Kategorie HS (hohe Sensibilisierungsstärke). Die Kategorie HS setzt sich aus fünf Substanzen die eindeutig eingeordnet waren und einer Substanz für die nur der Hinweis U → HS vorlag zusammen. Fünf Inhaltsstoffe (30 %) wurden dagegen als gering sensibilisierend eingeordnet. Die Kategorie GMS setzt sich aus zwei Stoffen die eindeutig in die Kategorie GMS eingeordnet sind und drei Stoffen, für die eine Tendenzaussage vorliegt zusammen.

In FP-0384 blieb die Gesamtzahl der Stoffe in Kategorie U und GMS gleich. Die Anzahl der Stoffe in Kategorie HS erhöht sich allerdings auf 9 Stoffe (45 %). Bei den drei zusätzlichen in HS eingeordneten Stoffen handelt sich um Tendenzaussagen, die auf Basis der verbesserten Datenlage möglich wurden. Es ist anzumerken, dass zudem drei Tendenzaussagen aus dem Vorläuferprojekt (2 x GMS und 1 x HS) in eindeutige Zuordnungen umgewandelt werden konnten.

Insgesamt wurde somit:

- die Bewertung für acht Reaktivverdünner bestätigt,
- für drei Reaktivverdünner wurde eine Tendenzaussage getroffen und
- für drei Inhaltsstoffe wurde eine endgültige Kategoriezuordnung möglich.

Die Gruppe der bewerteten Reaktivverdünner lässt sich weiterhin in folgende Untergruppen aufteilen: die Gruppe der Monoglycidylether (GE) und die Gruppe der Diglycidylether (DGE). Die Gruppe der GE umfasst 8 Vertreter (MW: 130 bis ~260), die Gruppe der DGE 6 Inhaltsstoffe (MW: 202 bis ~300; Cyclohexandimethanol-DGE wurde mitgezählt, die Polymere aus Propylenglykol und Epichlorhydrin (CASRN 26142-30-3 und CASRN 9072-62-2) wurden dabei mit DiPG-DGE (CASRN 41638-13-5) zusammengefasst). Die drei in FP-0384 neu hinzugekommenen und zu den Reaktivverdünnern gezählten Inhaltsstoffe lassen sich grob ebenfalls als Di- bzw. Triglycidylethern einordnen.

Für die Bewertung der noch nicht eingeordneten Reaktivverdünner wurde bereits im Vorgängerprojekt die Durchführung einer *in vitro* Reihentestung verschiedener Mono-, Di- und Triglycidylethern im optimierten DPRA (Peptidreaktivität/ Haptenisierung), dem KeratinoSens™ und dem h-CLAT (Reifung dendritischer Zellen) vorgeschlagen. Im damaligen

Projekt konnte bereits ein Teil dieser *in vitro* Testung realisiert werden (8 Reaktivverdünner wurden im KeratinoSens™ getestet). Im aktuellen Projekt wurden nun noch die fehlenden Testungen im KeratinoSens™ nachgeholt (2-Ethylhexyl-GE und o-Kresyl-GE), sowie die Testung von 10 Reaktivverdünnern im DPRA realisiert (siehe auch Kapitel 5).

Anhand der Detailergebnisse, die in Kapitel 5.2.1, Tabelle 27 aufgeführt sind, lässt sich für die 10 getesteten Reaktivverdünner folgende Relativaussage treffen:

Sehr geringe Reaktivität – jedoch mit hoher Unsicherheit für:

- C12/C14-Mono-GE

Geringere Reaktivität und somit wahrscheinlich Wirkstärke von:

- 2-EH-GE
- Polypropylenglykol-DGE
- Butyl-GE

Höhere Reaktivität und somit wahrscheinlich höhere Wirkstärke von:

- Phenyl-GE
- 1,4-Butanol-DGE
- Neopentylglykol-DGE
- 1,6-Hexandiol-DGE

Höhere Reaktivität – jedoch mit größerer Unsicherheit für:

- Trimethylolpropan-TGE
- o-Kresylglycidylether

Diese relative Einordnung wurde stoffspezifisch jeweils betrachtet und in Zusammenschau mit anderen *in vitro* Ergebnissen bewertet.

Tabelle 34 Ergebnisse für die im KeratinoSens™ überprüften Reaktivverdünner (Gegenüberstellung der Ergebnisse der Testung aus FP-0324 und FP-0384)

Substanz	FP-0324			FP-0384			
	Geo Mean EC1.5 [µM]	IC50 [µM]	Predicted LLNA EC3 [%] ¹	Geo Mean I _{max} [µM]	Geo Mean EC1.5 [µM]	IC50 [µM]	Geo Mean I _{max} [µM]
Butyl-GE ²	59	727		107	48,89	599,2	59,77
Neopentylglykol-DGE	50,31	258,23	1,87	339,55	-	-	-
Polypropylenglykol-DGE	50,07	693,69	20,41	147,34	-	-	-
1,4-Butanol-DGE	41,69	372,4	2,3	174,13	-	-	-
2-Ethylhexyl-GE	-	-	-	-	28,81	255,02	3,93
Phenyl-GE	21,34	196,12	0,6	52,64	16,1	187,0	60,89
Trimethylolpropan-TGE	19,89	93,89	0,58	64,68	-	-	-
Phenyl-GE ²	18,05	174	0,6	53	-	-	-
1,6-Hexandiol-DGE	16,91	209,61	0,99	120,62	-	-	-
o-Kresyl-GE	-	-	-	-	15,39	151,15	28,75
C12/C14-GE	10,6	51,5	0,4	2,98	-	-	-
Cyclohexandimethanol-DGE	9,12	150,59	0,64	258,36	-	-	-

1: Berechnet auf Basis der Gleichung 1 in Delaine et al (2011), wurde aufgrund von Unsicherheiten in der Anwendbarkeit der Gleichung auf die Prüfsubstanzen nicht zur Bewertung herangezogen

$\log EC3 (LLNA) = -2,022 + 0,00451 * EC_{KS4,5} (KeratinoSens) + 0,00174 * IC50 (KeratinoSens)$

2: historische Kontrolle, BGE: Nachtrag zum Originalstudienbericht aus Delaine et al. (2011)

Die Inhaltsstoffe sind in der Tabelle gemäß absteigender Reihenfolge ihrer EC1,5 Werte im KeratinoSens™ wie sie aus FP-0324 erhalten wurden angeordnet. Dabei gilt: je kleiner der EC1,5 (bzw. EC2, EC3 oder EC4,5) Wert ist, desto größer die sensibilisierende Wirkstärke. Die relative Rangreihenfolge bezüglich der sensibilisierenden Wirkstärke kann demnach ganz einfach abgelesen werden. Im KeratinoSens™ dementsprechend am wenigsten wirksam wäre der Butyl-GE, während Cyclohexandimethanol-DGE die am stärksten wirksame Substanz ist.

Für die in FP-0384 wider getesteten Referenzsubstanzen BGE und PGE wurden zum Vorläuferprojekt vergleichbare EC1,5 und IC50 Werte erzielt. Für die Testung der Mono-GE in FP-0384 ergibt sich, dass die Stärke der Keratinozytenreaktion von BGE über 2-EH-GE zu PGE und o-Kresyl-GE hin zunimmt. Das vergleichbare Ergebnis des o-Kresyl-GEs mit dem PGE stützt die bereits getroffene Zuordnung in die Kategorie HS für den o-Kresyl-GE.

Wie bereits in FP-0324 besprochen fällt der C12/C14-Mono-GE wahrscheinlich aufgrund des stark zytotoxischen Potentials aus der Reihe.

Die Ergebnisse aus dem h-CLAT sind im Vorgängerprojekt ausgiebig diskutiert (Heine et al., 2012). Zur Wirkstärkebewertung wurde damals ein noch nicht validierter Ansatz herangezogen (Inhaltsstoffe mit höherer Wirkstärke führen bereits bei Konzentrationen deutlich oberhalb der IC80-Werte (Konzentration, bei der noch 80% der Zellen leben) zu einer Induktion der untersuchten Oberflächenmarker (CD86 und/oder CD54) – gemäß der damaligen Empfehlung von Herrn Vohr). Für einige Inhaltsstoffe war danach eine relative Bewertung bezüglich ihrer sensibilisierenden Wirkstärke möglich. Ordnet man die Substanz von „schwach“ nach „deutlich“ sensibilisierend im h-CLAT ergibt sich folgende Reihenfolge:

- Neopentylglykol-DGE
- Polypropylenglykol-DGE
- 1,4-Butandiol-DGE
- 1,6-Hexandiol-DGE und Trimethylolpropan-TGE

Nachdem die Ergebnisse aus den drei *in vitro* Tests einzeln betrachtet wurden, sollen die möglichen Schlussfolgerungen bei gemeinsamer Betrachtung skizziert werden.

Beim Vergleich der relativen Rangreihenfolge innerhalb der drei durchgeführten Tests ergeben sich einerseits Widersprüche, andererseits aber auch Hinweise, die alle in dieselbe Richtung weisen.

Folgende sechs Substanzen weisen widersprüchliche *in vitro* Ergebnisse auf:

Neopentylglykol-DGE zeigt im DPRA eine vergleichbare Reaktivität wie die als HS eingeordneten HDDGE und BDDGE. Im h-CLAT war der Inhaltsstoff jedoch relativ weniger wirksam als diese eng verwandten Diglycidylether. Im KeratinoSens™ zeigt sich hingegen ein EC1,5 Wert im Bereich des als schwach sensibilisierend eingeordneten BGE. Während C12/C14-GE und Cyclohexandimethanol-DGE im KeratinoSens™ die am stärksten wirksamen Substanzen der Testreihe darstellten, waren sie im h-CLAT negativ. Das Ergebnis für den C12/C14-GE deutet wiederum auf eine geringere Reaktivität hin. Cyclohexandimethanol-DGE wurde nicht im DPRA überprüft. 2-EH-GE zeigte im DPRA im Vergleich zu den anderen Glycidylethern eine geringere Reaktivität (noch unter BGE). Im KeratinoSens™ wird jedoch eine Reaktivität im Bereich des als stark sensibilisierend eingeordneten PGE ermittelt. Der Inhaltsstoff wurde nicht im h-CLAT geprüft. Dass o-Kresyl-GE und Phenyl-GE im h-CLAT negativ sind, widerspricht nicht ihrer Einordnung in die Kategorie HS, die auf Basis bereits vorhandener Daten getroffen und durch die hohe Reaktivität im DPRA und KeratinoSens™ gestützt wurde. Jeder *in vitro* Test bildet nur einen der notwendigen Schritte in einer ganzen Kaskade ab, die letztlich zur Auslösung einer Kontaktsensibilisierung führen. Die Beurteilung der sensibilisierenden Eigenschaften eines Inhaltsstoffes, allein auf Basis der Aktivierung von dendritischen Zellen, ist nicht ausreichend.

Hinweise für gleiche Tendenzen in den drei durchgeführten Tests ergeben sich für diese fünf Inhaltsstoffe:

Für Butyl-GE wurde im DPRA eine geringe Reaktivität festgestellt. Der Butyl-GE zeigt im KeratinoSens™ im Vergleich zu anderen Härtern höhere EC1,5 Werte (somit weniger reaktiv) und war im h-CLAT bis zur höchsten getesteten Konzentration negativ. Für Polypropylenglykol-DGE liegen die Ergebnisse in allen drei Test im hinteren Bereich des Feldes (relativ weniger reaktiv). Für 1,4-Butandiol-DGE, 1,6-Hexandiol-DGE und Trimethylolpropan-TGE

weisen die Testergebnisse in allen drei Tests ebenfalls in dieselbe Richtung und bestätigen somit die eher als stark eingeordnete Wirkstärke.

Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 35 dargestellt.

Tabelle 35 Zuordnung sensibilisierender Wirkstärkekategorien zu den getesteten Reaktivverdünner auf Basis der *in vitro* Testergebnisse aus FP-0324 und FP-0384

Substanz	FP-0324	DPRA (rel. Reakt.)	KS EC1.5 [µM]	h-CLAT positiv	FP-0384	Kommentar
Butyl-GE	GMS	gering	59/48,89	Nein	GMS	Bestätigt
Neopentylglykol-DGE	U	stärker	50,3	(Ja)	U → HS	DPRA Widerspruch zu KS KS Hinweis GMS h-CLAT Widerspruch
Polypropylen-glykol-DGE	U → GMS	gering	50,1	Nein (Ja)	GMS	DPRA Hinweis gering KS Hinweis GMS h-CLAT Widerspruch
1,4-Butanol-DGE	HS	stärker	41,7	Ja	HS	Bestätigt
2-EH-GE	U	gering	28,81	-	U → HS	DPRA Widerspruch zu KS KS zwischen HS und GMS
Phenyl-GE	HS	stärker	21,3/18,0 /16,1	Nein	HS	Bestätigt im DPRA und KS h-CLAT Widerspruch
Trimethylolpropan-TGE	U → HS	stärker (unsicher)	19,9	Ja	HS	DPRA, KS & h-CLAT weisen in dieselbe Richtung
1,6-Hexandiol-DGE	HS	stärker	16,9	Ja	HS	DPRA, KS & h-CLAT weisen in dieselbe Richtung → HS bestätigt
o-Kreslyl-GE	HS	stärker (unsicher)	15,39	Nein	HS	Bestätigt im DPRA und KS h-CLAT fraglich
C12/C14-GE	U → GMS	gering (unsicher)	10,6	Nein	U → GMS	DPRA bestätigt GMS KS GMS nicht bestätigt h-CLAT fraglich
Cyclohexandimethanol-DGE	U	-	9,1	Nein	U	Widerspruch KS & h-CLAT, keine weitere Testung da Testmaterial nicht mehr verfügbar

KS: KeratinoSens™, neue Testung in FP-0384

Für die Gesamtbewertung gemäß sensibilisierender Wirkstärke im Projekt FP-0384 bedeutet dies:

- Für fünf Inhaltsstoffe wurde die bereits getroffene Bewertung durch die *in vitro* Befunde gestützt (BGE, PGE, 1,4-BDDGE, 1,6-HDDGE, o-Kresyl-GE).
- Bei zwei Inhaltsstoffen lieferten die *in vitro* Befunde zusätzliche Hinweise für eine endgültige Wirkstärkenzuordnung (Polypropylenglykol-DGE und Trimethylolpropan-TGE)
- Und bei vier Inhaltsstoffen konnten die widersprüchlichen Ergebnisse nicht aufgelöst werden und andere Daten (meist tierexperimentelle Studien) liefern den Ausschlag für die Bewertung (Neopentylglykol-DGE, C12/C14-GE, Cyclohexandimethanol-DGE, 2-EH-GE)

7.2 Zusammenfassung allgemein

Insgesamt wurden im vorliegenden Projekt anhand der aufgestellten Methodik Bewertungen gemäß der sensibilisierenden Wirkstärke für insgesamt 66 Inhaltsstoffe durchgeführt.

7.2.1 Datenlage

Anhand eines Ampelsystems wird versucht, die Datenlage substanzspezifisch auf die Eignung zur Wirkstärkenbewertung zu überprüfen. Dabei gelten folgende Grundlagen:



Kriterium	Anzahl der Inhaltsstoffe (Bewertung 2012)	Anzahl der Inhaltsstoffe (Bewertung 2016)
Keine/ kaum Daten verfügbar (rot)	19 (37,3 %)	15 (22,7 %)
„Unvollständiger“ Datensatz → eine quantitative Bewertung ist erst durchzuführen, wenn weitere Testergebnisse vorliegen (orange)	15 (29,4 %)	25 (37,9 %)
„Vollständiger“ Datensatz → es wird erwartet, dass eine erste quantitative Analyse der Wirkstärke durchführbar ist (grün)	17 (33,3 %)	28 (39,4 %)

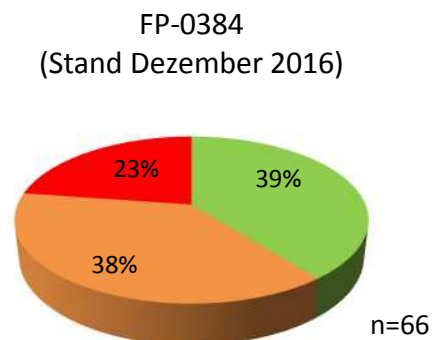
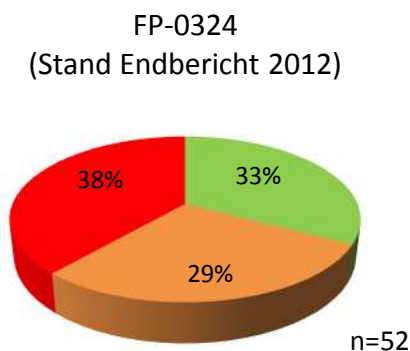


Abbildung 18 Abbildung Datenlage der Inhaltsstoffe im Vorläuferprojekt FP-0324 und im Projekt FP-0384

Wie anhand der Tabelle und der graphischen Auswertung (Abbildung 18) deutlich wird hat sich die Zahl der zu bewertenden zwar insgesamt erhöht, es wurde aber trotzdem ein Rückgang der Anzahl an Substanzen für die gar keine oder kaum Daten vorhanden waren verzeichnet. Auf Basis der zur Verfügung stehenden Daten wird davon ausgegangen, dass für knapp 40 Prozent der Stoffe eine Bewertung möglich sein müsste. Allerdings liegen ebenfalls für knapp 40 Inhaltsstoffe immer noch ungenügende Datensätze vor.

7.2.2 Verbesserte Datenverfügbarkeit über REACH 2013

Mit der 2013 verstrichenen REACH Abgabefrist hat sich die Zahl der Substanzen zu denen Daten zum Endpunkt Sensibilisierung verfügbar sind deutlich erhöht. In einer Auswertung der seit 2008 bis 2014 eingereichten Daten durch Luechtefeld et al. (2016) findet man, dass insgesamt 19111 Studien zum Thema Hautsensibilisierung eingereicht wurden. Für 1470 Substanzen liegen Daten aus dem LLNA vor, für 2787 Daten aus dem GPMT, für 762 Substanzen liegen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Daten vor und für 139 Substanzen liegen nur *in vitro* Daten vor. Insgesamt sind 21 % aller registrierten Chemikalien als sensibilisierend eingestuft (i.e. 1255 Substanzen). Erwartungsgemäß hat sich dies auch auf die im Projekt zu bewertenden Substanzen ausgewirkt. Für insgesamt acht Inhaltsstoffe³⁸ liegen zusätzliche Daten aus dem REACH Dossier vor. Dies hat die finale Wirkstärkenbewertung von fünf Inhaltsstoffen wesentlich beeinflusst.

7.2.3 Zusatzbewertung - Einstufungen

Es wurden 14 der zu bewertenden Inhaltsstoffe identifiziert, die auch aufgrund anderer Subanzeigenschaften eingestuft werden, deren Gefahren für die Gesundheit schwerwiegender als die Hautsensibilisierung anzusehen sind. Die Bewertung der Hautsensibilisierung tritt folglich in den Hintergrund. Darunter befinden sich neun Härter und fünf Reaktivverdünner.

- 4,4'-Diaminodiphenylmethan (CASRN 101-77-9; zusätzlich H350 (R45) und R68)
- Ethylendiamin (EDA; CASRN 107-15-3; zusätzlich H334 (R42))
- Phthalsäureanhydrid (CASRN 85-44-9; zusätzlich H334 (R42))
- Tetrahydrophthalsäureanhydrid (CASRN 85-43-8; zusätzlich H334 (R42))
- Hexahydrophthalsäureanhydrid (CASRN 85-42-7; zusätzlich H334 (R42))
- Methyltetrahydrophthalsäureanhydrid (CASRN 11070-44-3; zusätzlich H334 (R42))
- Methylhexahydrophthalsäureanhydrid (CASRN 25550-51-0; zusätzlich H334 (R42))
- tert-Butylphenol (CASRN 98-54-4; zusätzlich H361f (R62))
- Bisphenol A (CASRN 80-05-7; zusätzlich H361f (R62))
- Butylglycidylether (BGE; CASRN 2426-08-6; zusätzlich H351 (R40))
- Versäureglycidylester (z.B. Cadura E 10; CASRN 26761-45-5; zusätzlich H340 (R46))
- Trimethylolpropan-Triglycidylether (CASRN 30499-70-8, zusätzlich H360)
- Phenylglycidylether (PGE; CASRN 112-60-1; zusätzlich H350 (R45))
- Propantriolglycidylether (1,2,3-Propanetriol, polymer with 2-(chloromethyl)oxirane), CASRN 90529-77-4 / 25038-04-4; zusätzlich H361)

Folgende H-Sätze wurden dabei berücksichtigt:

- H334 (alt R42): Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden auslösen
- H340 (alt R46): Kann genetische Defekte verursachen
- H350 (alt R45): Kann Krebs erzeugen
- H351 (alt R40): Kann vermutlich Krebs erzeugen

³⁸ CASRN: 136210-32-7, 1760-24-3, 694-83-7, 2461-15-6, 30499-70-8, 17351-75-6, 3101-60-8, 2210-79-9

- H360F (alt R60): Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen
- H360D (alt R61): Kann das Kind im Mutterleib schädigen
- H361f (alt R62): Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen
- H361d (alt R63): Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen
- H370 (alt R39): Schädigt die Organe
- H371 (alt R68): Kann die Organe schädigen

7.2.4 Bewertung der projektbezogenen *in vitro* Testung

Wie bereits in 5.2.4 beschrieben stellt das umfangreiche Testprogramm im aktuellen Projekt eine deutliche Verbesserung der Datenlage dar. Dies spiegelt sich beispielsweise bei der Bewertung von o-Kresylglycidylether wider (7.1.11.15). Im Vorgängerprojekt wurde die Datenlage noch als völlig unzureichend charakterisiert (rot). Mittlerweile ist ein Registrierungsdossier mit einigen Tierdaten vorhanden und die mit vier Schlüsselergebnissen fast vollständige *in vitro* Testbatterie stellt nun eine ausreichende Datengrundlage für eine quantitative Bewertung dar (grün).

Wie bereits mehrfach erwähnt ist keines der vorhandenen Testsysteme (*in vivo*, *in vitro* und *in silico*) perfekt und die integrierte Analyse von mehr als einem Testergebnis bedarf ein hohes Maß an Expertenwissen (Basketter et al., 2015).

Beispielhaft soll die Bewertung des Phthalsäureanhydrids (CASRN 85-44-9) hier angeführt werden. Für diesen Inhaltsstoff liegen aus der Literatur viele *in vitro* Untersuchungen vor. Es liegen Tests zur Proteinreaktivität, zur Aktivierung von Keratinozyten und zur Reifung von dendritischen Zellen vor.

Wird die Haptensierung (Proteinbindungsreaktion) untersucht (DPRA und verwandte Tests) wird deutlich, dass das Phthalsäureanhydrid gegenüber Lysin eine hohe Reaktivität aufweist, wohingegen die Reaktivität gegenüber Cystein sehr gering ausgeprägt ist. Tests, bei denen ein Marker, der nach Modifikation eines Cysteins im Nrf2 Protein aktiv wird, als Ausleseparameter dient (zum Beispiel ARE-Test, KeratinoSens™, LuSens) liefern entsprechend negative Ergebnisse. In den Tests, die die Reifung dendritischer Zellen untersuchen (U-SENS, h-CLAT, MUSST), kommt es meist zu negativen Ergebnissen. Bei einem Test basierend auf einem 3D-Hautmodell ergibt sich ein positives Ergebnis. Die Gensignaturanalyse in Keratinozyten gemäß SENS-IS, in der ebenfalls das Testmaterial epikutan aufgetragen wird (3-D Hautmodell), liefert das einzig quantitativ auswertbare *in vitro* Ergebnis. Bereits bei einer Testkonzentration von 1 % werden die Kriterien für ein positives Testergebnis erfüllt und somit gilt dies als ein Hinweis auf die Kategorie HS. Bei diesem Inhaltsstoff kommt es bei Kontakt mit Wasser zu einer schnellen Hydrolyse (Halbwertszeit < 1 min bei 25 °C). Diese Hydrolyse findet im wässrigen Milieu der zellbasierten *in vitro* Tests statt, jedoch nicht bei der epikutanen Auftragung im LLNA oder den *in vitro* Tests mit 3D-Hautmodellen. Dies könnte somit das unterschiedliche Testergebnis in den unterschiedlichen Testtypen erklären. Insgesamt liegen also mechanistische Erklärungen vor, die die unterschiedlichen Testergebnisse erklären können und deren Widersprüchlichkeit auflösen. Dies ist jedoch nicht in allen Fällen möglich.

Die Variabilität der unterschiedlichen Testsysteme wurde mittlerweile ebenfalls untersucht. In Luechtefeld et al. (2016) wird deutlich, dass bei Vorhandensein von mehr als einem Tierversuch zur selben Substanz die Übereinstimmung bezüglich der sensibilisierenden

Eigenschaften nur zu circa 80-90 % übereinstimmen (siehe Abbildung 19), demnach sollte auch von keiner Alternativmethode oder ITS ein besseres Ergebnis erwartet werden.

	Buehler	GPMT	Patch-test	LLNA
Buehler	95.1% (344 chem.)	91.8% (364 chem.)	87.8% (58 chem.)	76.8% (212 chem.)
GPMT		93% (624 chem.)	90.5% (107 chem.)	77.4% (403 chem.)
Patch-test			92.1% (24 chem.)	78.3% (40 chem.)
LLNA				88.5% (296 chem.)

Abbildung 19 Übereinstimmung der resultierenden Einstufung, wenn im REACH Dossier (2008-2014) mindestens zwei unterschiedliche Studien zur Hautsensibilisierung vorliegen

Abbildung entnommen aus Luechtefeld et al. (2016)

Derselben Meinung sind auch andere Autoren (Kolle et al., 2013), die bei wiederholter Testung derselben Chemikalien im LLNA nur eine Übereinstimmung der Testergebnisse von 77 % fanden (geprüft wurden 22 Chemikalien). Die Unterschiede werden durch die biologische Variabilität begründet. In diesem Sinne ist von keiner Alternativmethode eine bessere Vorhersage als dem derzeitigen Goldstandard zu erwarten, speziell sollte jedoch immer darauf geachtet werden, ob in einem Test die schwach positiven Substanzen von den schwach negativen Substanzen eindeutig zu unterscheiden sind.

Insgesamt wird die Verwendung von *in vitro* Tests somit als für die Zukunft zielführend eingeschätzt und die vorgelegten Inhaltsstoffbewertungen belegen die Nützlichkeit dieser Versuche. Meist kann jedoch noch keine quantitative Auswertung erfolgen, da validierte cut-off Werte zur Wirkstärkenbewertung fehlen. Dies ist Schwerpunkt der aktuellen wissenschaftlichen Forschung.

7.2.5 Finale Bewertung durch FoBiG und IVDK (Vergleich)

Auf Basis der zur Verfügung stehenden Daten (siehe 7.2.1) wurde davon ausgegangen, dass für knapp 40 Prozent der Stoffe eine Bewertung möglich sein müsste. Die Abbildung 20 macht deutlich, dass durch Datenübertragung bei strukturell verwandten Stoffen oder die möglichen Relativbewertungen auf Basis der *in vitro* Tests sogar für 55 % (n = 46) der Inhaltsstoffe eine eindeutige Wirkstärkenkategorie zugeordnet werden konnte. Für 23 Inhaltsstoffe wurde dabei eine hohe sensibilisierende Wirkstärke gefunden (Kategorie HS) und für 13 Stoffe geht man von einer geringen bis mäßigen sensibilisierenden Wirkstärke aus (Kategorie GMS).

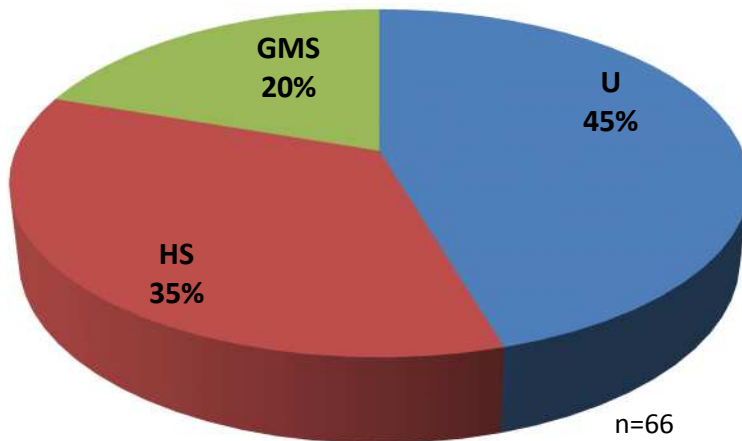


Abbildung 20 Übersicht der finalen Wirkstärkeneinordnung in FP-0384

Zählt man zu den eindeutigen Bewertungen die Tendenzaussagen (d.h. starker Hinweis auf eine bestimmte Wirkstärkenkategorie) hinzu, ergibt sich die in Abbildung 21 dargestellte Verteilung. Man sieht hier, dass sogar bis zu 70 % der Stoffe (n = 56) mit einer gewissen Datengrundlage zumindest in Richtung einer Kategorie eingeordnet sind (plus sechs Stoffe Kategorie U → GMS und vier Stoffe Kategorie U → HS).

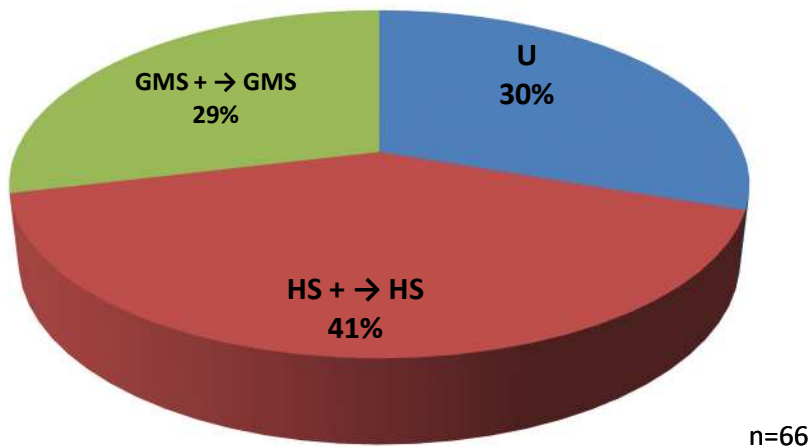


Abbildung 21 Übersicht der finalen Wirkstärkeneinordnung in FP-0384, die Kategorien HS und GMS umfassen zusätzlich die Tendenzaussagen

Für die praktische Anwendung werden jedoch neben den eindeutigen Bewertungen und den Tendenzaussage (d.h. starker Hinweis auf eine bestimmte Wirkstärkenkategorie, gekennzeichnet mit U → Kategorie), auch noch die weniger starken Hinweis auf eine bestimmte sensibilisierende Wirkstärke hinzugezählt. Bei diesen „schwachen Hinweisen“, ist die Datenlage weniger eindeutig als bei den Tendenzaussage: Die so eingeordneten Inhaltsstoffe sind in der finalen Inhaltsstoffbewertung (Tabelle 36) gekennzeichnet mit U (→ Kategorie). Die betreffenden Stoffe sind:

- für die Kategorie U (→HS): N-Aminoethylpiperazin (AEP) und
- für die Kategorie U (→GMS): Bis(4-(1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethylamino)-3-methylcyclohexyl)methan, 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan und 2,4,6-Tris(dimethylamino-methyl)phenol.

Tabelle 36 Liste aller 66 gemäß ihrer sensibilisierenden Wirkstärke bewerteten Inhaltsstoffe

Erstbewertung	CASRN	Substanz	FP-0324 - Wirkstärke		FP-0384 - Wirkstärke	
			FoBiG	IVDK	FoBiG	IVDK
		Epoxidharze				
FP-0324	25068-38-6	Bisphenol A-Harze	HS	H	HS→SHS	H
FP-0324	25085-99-8	Reaktionsprodukt Bisphenol A Epichlorhydrin	HS	H	HS→SHS	H
FP-0324	1675-54-3	Bisphenol-A-Epichlorhydrin MW 340	HS	H	HS→SHS	H
FP-0324	9003-36-5	Bisphenol F-Harze	HS	H	HS→SHS	H
FP-0324	28064-14-4	Bisphenol-F-Epichlorhydrin	HS	H	HS→SHS	H
FP-0384	13410-58-7	Epoxidharz-Monomer a) (aus O'Boyle)	-	-	HS	U
FP-0384	-	Epoxidharz-Monomer b) (aus O'Boyle)	-	-	HS	U
FP-0384	-	Epoxidharz-Monomer c) (aus O'Boyle)	-	-	HS	U
		Härter, aromatische Amine				
FP-0324	101-77-9	4,4'-Diaminodiphenylmethan	GMS	U	GMS	U
		Härter, aliphatische Amine				
FP-0324	107-15-3	Ethylendiamin (EDA)	HS	S	HS	S
FP-0324	111-40-0	Diethylentriamin (DETA)	HS	S	HS	S
FP-0324	56-18-8	Dipropylentriamin	U → GMS	U	U → HS	U → S
FP-0324 / FP-0384	25620-58-0 / 25513-64-8	Trimethylhexamethylendiamin (TMD) / 2,2,4-Trimethylhexan-1,6-diamin (Einzelisomer)	HS	U	HS	U → S
FP-0324	112-24-3	Triethylentetramin (TETA)	HS	S	HS	S
FP-0324	109-55-7	N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan	U → GMS	U	U → GMS	U
FP-0324	112-57-2	Tetraethylenpentamin (TEPA)	GMS	U	GMS	U → S
FP-0324	4067-16-7	Pentaethylenhexamin (PEHA)	GMS	U	GMS	U

FP-0324	68131-73-7	Polyethylenpolyamin	GMS	U	GMS	U
FP-0324	26336-38-9	Polyethylenamin	GMS	U	GMS	U
FP-0384	2372-82-9	N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin (Bis(aminopropyl)laurylamin)	-	-	U	U
Härter, cycloaliphatische Amine						
FP-0324	1761-71-3	4,4'-Diaminocyclohexylmethan	U → GMS	U	U → GMS	U
FP-0324	136210-32-7	Bis(4-(1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethylamino)-3-methylcyclohexyl)methan	U	U	U (→ GMS)	U
FP-0324	140-31-8	N-Aminoethylpiperazin (AEP), 2-Piperazin-1-ylamin	U	U	U (→ HS)	U → s
FP-0324	2855-13-2	Isophorondiamin (IPD), 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin	HS	H	HS	H
FP-0324	3312-60-5	3-Cyclohexylaminopropylamin	U	U	U	U
FP-0324	694-83-7	1,2-Diaminocyclohexan (DCH)	U	U	U	U
FP-0384	2579-20-6	1,3-Cyclohexylen-bis(methylamin)	-	-	U	U
Härter, sonstige						
FP-0324	1477-55-0	m-Xylidendiamin (MXDA)	HS	H	HS	H
FP-0324	73050-11-0	m-Xylylendiamin/Acrylonitril Adduct	U	U	U → GMS	U
FP-0324	1760-24-3	N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan	U	U	U → GMS	U
FP-0324	2997-01-5	Polyoxyalkylenamin, 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	U	U	U (→ GMS)	U
FP-0384	919-30-2	3-Aminopropyltriethoxysilan	-	-	GMS	U
FP-0384	38294-64-3	Oligomerisierter Härter: 4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin	-	-	U → GMS	U
FP-0384	135108-88-2	Formaldehyd, Polymer mit Benzenamin, hydriert	-	-	U	U
FP-0384	90640-46-3	Polyethylenpoly-, triethylentetramin	-	-	U	U
Säureanhydride						
FP-0324	85-44-9	Phthalsäureanhydrid	HS → SHS	U	HS → SHS	U

FP-0324	85-43-8	Tetrahydrophthalsäureanhydrid	HS	U	HS	U
FP-0324	85-42-7	Hexahydrophthalsäureanhydrid	HS	U	HS	U
FP-0324	11070-44-3	Methyltetrahydrophthalsäureanhydrid	U	U	U	U
FP-0324	25550-51-0	Methylhexahydrophthalsäureanhydrid	U	U	U	U → S
		Sekundäre und tertiäre Amine				
FP-0324	93941-62-9	3-((6-Aminotrimethylhexyl)amino)propionitril (= N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin)	U	U	U	U
FP-0384	98-94-2	N,N-Dimethyl-cyclohexanamin	-	-	GMS	U
		Phenole				
FP-0324	98-54-4	tert-Butylphenol	GMS	S	GMS	S
FP-0324	80-05-7	Bisphenol A	GMS	S	GMS	S
FP-0324	90-72-2	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	U	U	U (→ GMS)	U → H
FP-0384	71074-89-0	Bis[(dimethylamino)methyl]phenol	-	-	U	U
		Reaktivverdünner				
FP-0324	2426-08-6	Butylglycidylether (BGE)	GMS	S	GMS	S
FP-0324	2425-79-8	1,4-Butandiol-diglycidylether (BDDGE)	HS	H	HS	H
FP-0324	17557-23-2	Neopentylglykol-diglycidylether	U	U	U → HS	U
FP-0324	2461-15-6	2-Ethylhexylglycidylether (2-EH-GE)	U	U	U → HS	U
FP-0324	16096-31-4	1,6-Hexandiol-diglycidylether (HDDGE)	HS	H	HS	H
FP-0324	26761-45-5	Versäureglycidylester (z.B. Cadura E 10)	GMS	U	GMS	U → S
FP-0324	30499-70-8	Trimethylolpropan-triglycidylether	U → HS	U	HS	U
FP-0324	68609-97-2	C12/C14-Monoglycidylether	U → GMS	U	U → GMS	U
FP-0324	26142-30-3	Polypropylenglykoldiglycidylether/ Polyoxypropylen-diglycidylether	U → GMS (Ü)	U	GMS	U
FP-0324	9072-62-2	Polypropylenglycol-chloromethyloxiran polymer	U → GMS (Ü)	U	GMS (Ü)	U → S
FP-0324	41638-13-5	Dipropylenglycol-diglycidyl ether (DiPG-GE)	U	U	U	U
FP-0324	14228-73-0	Cyclohexandimethanol-diglycidylether	U / U	U / U	U	U
	17351-75-6	Cyclohexandimethanol-divinylether			U	U
FP-0324	3101-60-8	p-tert.-Butylphenol-monoglycidylether	U	U	U → HS	U → H

FP-0324	122-60-1	Phenylglycidylether (PGE)	HS →SHS	H	HS →SHS	H
FP-0324	2210-79-9	o-Kresylglycidylether	HS (Ü)	H	HS	H
FP-0324	26447-14-3	Kresyl-glycidylether, Isomerenmischung	HS	H	HS	H
FP-0384	90529-77-4 / 25038-04-4	Propantriol-glycidylether (1,2,3- Propantriol-glycidylether bzw. 1,2,3- Propanetriol, polymer mit 2- (chlormethyl)oxiran)	-	-	U	U
FP-0384	2386-87-0	7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl-7- oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat	-	-	U	S
FP-0384	28768-32-3	4,4'-Methylenbis[N,N-bis(2,3- epoxypropyl)anilin] (TGMDA)	-	-	U	S

Ü: Übertrag von anderer Substanz

Veränderung im Vergleich zu FP-0324

Neubewertungen in FP-0384

8 VORGESCHLAGENE UMSETZUNG DER PROJEKTERGEBNISSE UND WEITERFÜHRUNG DURCH DAS „EPOXIDHARZ INFORMATION SYSTEM“ (EIS)

8.1 Einführung

In den Abschnitten 1 bis 7 dieses Berichts lag der Schwerpunkt auf der gesundheitlichen Bewertung von Einzelstoffen in Epoxidharzsystemen unter dem Blickwinkel der (haut-)sensibilisierenden Eigenschaften. Diese Erkenntnisse sind nun zu nutzen, um praxisorientierte Informationen bereitzustellen, die die Verwertung der Erkenntnisse ermöglichen.

Hierzu wird im Folgenden ein Konzept für ein Epoxidharz-Informationssystem (EIS) entwickelt. Mit Hilfe dieses Instruments soll

- eine genauere Charakterisierung der Inhaltsstoffe von Epoxidharzsystemen bereitgestellt werden, die über das oben dokumentierte Ranking mit Zuweisung einer Wirkstärkekategorie hinausgeht,
- eine Möglichkeit geboten werden, auch das gesamte Produkt (Epoxidharzsystem) zu bewerten, da die zuvor betrachteten Einzelstoffe eine solche aggregierte Betrachtungsebene noch nicht ermöglichen, diese jedoch der eigentlichen Fragestellung aus der Praxis entspricht,
- zusätzliche Information bereitgestellt werden, die den sichereren Umgang mit Epoxidharzen mit dem Ziel der Vermeidung von Allergien dient.

Es bietet sich somit an, die Informationen des EIS im Internet aufbereitet zur Verfügung zu stellen.

Im Rahmen dieses Projekts erfolgt jedoch nur die Konzeptentwicklung für EIS, mit einigen ausgewählten Erstinformationen, wie sie in eine Internet-Plattform eingehen könnten. Die eigentliche Implementierung von EIS und die vollständige Befüllung mit Informationen sind nicht Gegenstand dieses Projekts.

Es ist darauf aufmerksam zu machen, dass eine solche Informationsplattform einer begleitenden kontinuierlichen Pflege bedarf:

- Es hatte sich gezeigt, dass für mehrere Stoffe derzeit noch keine (qualifizierte) Wirkstärkenbewertung durchgeführt werden konnte, da die Datenlage zum Zeitpunkt dieses Projekts teilweise noch zu eingeschränkt ist. Da jedoch in der Zukunft weitere Informationen von anderer Seite generiert werden (z.B. unter REACH), könnte dies späteren Aktualisierungsbedarf der Projektergebnisse bedeuten.
- Derartige Aktualisierungsmöglichkeiten werden einerseits stoffbezogen erwartet, andererseits aber auch in der Methodik. Da zunehmend *in vitro* Tests eingesetzt werden, müssen parallel an anderen Stellen auch weitere Methoden entwickelt werden, um integrierte Bewertungen der Testergebnisse in Bezug auf das Wirkpotenzial und auf die Wirkpotenz zu ermöglichen. Dazu gehören auch Modellierungen. Hier sind in der Zukunft relevante Fortschritte zu erwarten, die sich auf die Bewertungen von Epoxidharzinhaltsstoffen auswirken können.
- Die Stoffe wurden hier zunächst nur hinsichtlich der sensibilisierenden Eigenschaften bewertet. Parallel führen jedoch neue Erkenntnisse und regulatorische

Veränderungen auch zu neuen Einstufungen hinsichtlich anderer Stoffeigenschaften, die für eine Gesamtbewertung beachtet werden sollten und somit einzupflegen sind.

- Die in Abschnitt 8.3 vorgestellte Gemisчебewertung ist nur ein erster Ansatz, der im Detail der Überprüfung und der Konsentierung und möglicherweise auch der Ausweitung bedarf. Diese Themen sind außerhalb dieses Projekts zu bearbeiten.
- Weitere Hintergrundinformationen zur Vermeidung von Allergien am Epoxidharz-Arbeitsplatz waren nicht Gegenstand des vorliegenden Projekts; diese Informationen sind jedoch dringend erforderlich, da die Wirkstärkenbewertung nur *eine* Säule einer Gesamtstrategie betrifft. Hier sind entsprechende Verweise jeweils aktualisiert aufzunehmen und Fragestellungen zu thematisieren, die sich erst nach der künftigen Implementierung von EIS ergeben.

Die in Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** vorgestellten Vorschläge dienen demnach vor allem als qualifizierter Ausgangspunkt für die Implementierung und spätere Fortführung der Thematik.

8.2 EIS- Stoffliste

Die EIS- Stoffliste enthält eine umfassende Liste von möglichen Inhaltsstoffen (auch über die 66 in diesem Projekt bewerteten Stoffe hinaus), aufgeteilt in die Komponenten Harze, Härter, Reaktivverdünner und sonstige Inhaltsstoffe, je mit Informationen zu

- Identität,
- Einstufung und Kennzeichnung,
- Wirkstärkekategorie (sensibilisierende Wirkung),
- Häufigkeit der mit dieser Substanz beobachteten Allergien in der Praxiserfahrung am Menschen (Erkenntnisse aus Einzelfallbeobachtung, Epidemiologie und dermatologischer Testung),
- möglichen Verstärkerwirkungen durch „Carriereffekte“ oder zusätzliche Hautschädigung, z.B. durch korrosiv wirkende Stoffe,
- üblichen Konzentrationen (als Massen-Prozent) in Gemischen,
- Wassergefährdungsklassen und weitere ökotoxikologische Kenngrößen,
- Einstufungen hinsichtlich anderer gesundheitlicher Parameter außer der hautsensibilisierenden Wirkung,
- Arbeitsplatzgrenzwerten.

Weitere Charakteristika könnten hier zu ergänzen sein. Tabelle 37 enthält als Beispiel die erste Seite einer solchen ersten EIS- Stoffliste. Eine vorläufige Gesamtliste als Excel-Datei ist als Projektergebnis gesondert verfügbar.

8.3 EIS- Gemische

EIS- Gemische enthält ein Bewertungstool, um standardmäßig Epoxidharzsysteme (Gesamtsysteme und Einzelkomponenten) einer Wirkstärkenkategorie (Schwerpunkt: sensibilisierende Wirkung) zuzuordnen. Dabei werden gegenüber der Einzelstoffbewertung abweichende Definitionen für die Wirkstärkenkategorien erforderlich. Die Bewertung kann grundsätzlich bereits mit den Informationen durchgeführt werden, die aus Sicherheitsdatenblatt und technischem Merkblatt zur Verfügung stehen, sind jedoch auf dieser Ebene zwangsläufig ungenau und können ggf. durch qualifizierte Einzelfallbewertungen unter Berücksichtigung von Herstellerangaben und toxikologischen ergänzenden Informationen verfeinert werden bzw. zu abweichenden Ergebnissen führen.

Vergleiche verschiedener Epoxidharzsysteme sind nur dann sinnvoll, wenn diese auch in der technischen Anwendungsmöglichkeit vergleichbar sind.

Die Bewertung der Einzelstoffe im Gemisch (vgl. Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) geht in das Bewertungstool zu Gemischen ein.

8.3.1 Fachlicher Hintergrund

Die Gemischebewertung basiert auf der Annahme einer gewichteten Addition der Wirkung der Einzelstoffe nach Transformation der Information zur Wirkstärke in eine Bewertungszahl (Note). Dieser Ansatz einer gewichteten additiven Bewertung ist ein erprobtes Verfahren in der regulatorischen Toxikologie (AGS, 2008; 2012; Kalberlah und Wriedt, 1998), ist fachlich begründet (Kortenkamp et al., 2012) und wurde auch für sensibilisierende Wirkung gezeigt (Bonfeld et al., 2011).

Es wird also angenommen, dass mehrere Einzelstoffe, je mit sensibilisierender Wirkung, sich wie ein einziger Stoff mit wesentlich höherer Menge verhalten. Dies ist eine zwangsläufig ungenaue Annahme und kann in Abhängigkeit vom Wirkmechanismus, Dosisbereich und weiteren einwirkenden Faktoren in unterschiedlichem Maße zutreffen. Tatsächlich liegen für die wenigsten hier betrachteten Einzelstoffe ausreichende Daten zur Kombinationswirkung bei Mehrstoffexposition vor, so dass es sich bei dem Vorgehen um eine sinnvolle, toxikologisch gestützte Konvention im Falle spezifischen Nichtwissens handelt.

Ähnlich verhält es sich um den Einfluss der Menge eines Einzelstoffs oder der Gesamtmenge im Gemisch auf die Wahrscheinlichkeit einer Sensibilisierung. Der Dosis-Wirkungsverlauf mit zunehmender Menge ist oft nicht bekannt, stoffbedingt unterschiedlich und hängt vom Mechanismus der Sensibilisierung ab. Wir halten es zwar für abgesichert, dass die Sensibilisierung mit zunehmender Menge (Konzentration einer Substanz im Gemisch und auf der Haut) zunimmt. Es ist jedoch auch plausibel, dass diese Zunahme nicht linear von kleinsten Mengen bis zu 100% erfolgt. Die Datenlage hierzu ist nicht repräsentativ. Eine Arbeit von Kimber et al. (2008) zeigt jedoch, dass die Steigung der Zunahme bei niedrigen Flächendosen eines Hautallergens steiler ist und bei höherer Flächendosis auf der Haut weniger stark ausgeprägt ist. Aus diesem Grund wird im vorliegenden Projekt ein ähnlicher

Sättigungsverlauf angenommen, wenn insgesamt hohe Konzentrationen von sensibilisierenden Stoffen in einem Epoxidharz-Gemisch (einzeln oder additiv) vorliegen.

Schließlich zeigen einige Arbeiten, dass die Erfassung der Wirkstärke in Testsystemen erheblich vom Vehikel abhängig ist und dass bei vorgeschädigter Haut sich die Wirkstärke eines Allergens erhöhen kann (Kohli und Nedorost, 2016) (Gamer et al., 2008). Diese Überlegung wurde in dem hier entwickelten Konzept berücksichtigt, um einen „Verstärkungsfaktor“ zu begründen, sofern eine relevante Störung der Hautbarrierefunktion anzunehmen ist.

8.3.2 Input-Daten

Der Anwender des Verfahrens entnimmt die **Zusammensetzung des Stoffgemischs** dem Sicherheitsdatenblatt, soweit keine genauere Information vorliegt und ermittelt für die Stoffidentitäten die Registrierungsnummer als „**CAS-Nummer**“.

Sofern die **Mengenangaben** (Konzentrationen im Gemisch) im Sicherheitsdatenblatt als Spannen angegeben sind, werden vorläufig die oberen Mengenangaben verwendet. Eine Regel zum Abrunden bei Gesamtmengen über 100% bei Aufsummierung aller Inhaltsstoffe wurde bisher nicht entwickelt. Hierfür kann jedoch ohne prinzipielle Schwierigkeiten eine Konvention gefunden werden.

Standardannahmen für den Fall, dass Stoffe nicht mit einer CAS-Nummer identifiziert werden können und keine Mengenangaben vorliegen, wurden bisher nicht entwickelt. Hierfür kann jedoch ohne prinzipielle Schwierigkeiten eine Konvention gefunden werden.

Die **Wirkstärkenkategorie** für sensibilisierende Wirkstärke für den (mit der CAS-Nummer) identifizierten Einzelstoff kann der EIS-Liste (vgl. Abschnitt 8.2) entnommen werden. Ebenfalls aus der EIS-Liste kann die Information gewonnen werden, ob es sich um einen die **Hautbarriere schädigenden Stoff** handelt. In der vorläufigen version wurde unterstellt, dass (nur) ätzende Stoffe mit ausreichender Absicherung die Haut schädigen.

Das **Mischungsverhältnis** von Harz zu Härter in Mehrkomponenten-Systemen (z.B. 3:1) kann dem technischen Merkblatt für das Epoxidharzprodukt entnommen werden.

Diese Informationen werden für die Berechnung der Gefährdungszahl benötigt.

8.3.3 Berechnung der Gefährdungszahl

Die Berechnungsmethode weist den Parametern bei der Berechnung jeweils Ausgangswerte zu. Diese sind:

- Einem Stoff mit anzunehmender starker sensibilisierender Wirkung (HS; HS→SHS; U→HS; U) wird ein Wirkfaktor von 1500 (Notenwert) zugewiesen.
- Einem Stoff mit anzunehmender schwacher oder mäßiger sensibilisierender Wirkung (U→GMS; GMS) wird ein Wirkfaktor von 500 (Notenwert) zugewiesen.
- Diese Wirkfaktoren gelten nur bis zu einer Konzentration von bis zu 40% von sensibilisierenden Stoffen im Gemisch. Bei höheren Konzentrationen wird einheitlich angenommen, dass der Wirkfaktor sehr schwach ist. Daher wird hier ein Wirkfaktor in Höhe von 250 zugewiesen.

Unter Multiplikation mit der Konzentration und mit dem genannten Abschneidekriterium für eine schwache Steigung über 40% ergibt sich eine Gefährdungszahl für das Gemisch.

Dieses Konzept bedarf zum besseren Verständnis einiger theoretischer Beispiele:

Zusammensetzung Gemisch:	Gefährdungszahl			
	Beitrag durch „starke“ Sensibilisierer (W-Faktor 1500)	Beitrag durch „starke“ Sensibilisierer (W-Faktor 500)	Beitrag oberhalb von 40% (W-Faktor 250)	Gesamt
30% HS; 10% GMS, 60% andere	0,3 x 1500	0,1 x 500	0 x 250	500
10% HS; 30% GMS, 60% andere	0,1 x 1500	0,3 x 500	0 x 250	300
20% HS, 30% GMS; 50% andere	0,2 x 1500	0,2 x 500	0,1 x 250	425
50% HS, 20% GMS; 30% andere	0,4 x 1500	0 x 500	0,3 x 250	675
10% HS; 50% GMS; 40% andere	0,1 x 1500	0,3 x 500	0,2 x 250	350

- Nun wird zusätzlich ein Verstärkungsfaktor (für den Fall, dass hautschädigende Stoffe in ausreichender Konzentration im Gemisch auftreten) eingeführt. Dieser Verstärkungsfaktor wird mit dem Wert 10 angenommen.
- Es wird keine verstärkende Wirkung angenommen, wenn im Gemisch weniger als 10% ätzender Stoffe vorliegen, da dann eine ausreichende Verdünnung unterstellt wird.

Durch Multiplikation der Konzentration ätzender Stoffe mit dem Verstärkungsfaktor 10 ergibt sich ein Multiplikator, mit dem die Gefährdungszahl (siehe oben) zu multiplizieren ist, um schließlich die finale Gefährdungszahl für das Gemisch zu erhalten.

Zusammensetzung Gemisch:	Gefährdungszahl			
	Gesamt oben) Verstärker	(siehe ohne	Multiplikator für Verstärkung durch Σ ätzende Stoffe: (Konz. in %/ 100 x Verstärkerfaktor 10)	Gesamt <u>mit</u> Verstärker (Spalte 2 x Spalte 3)
30% HS; 10% GMS, 60% andere; 10% ätzende Stoffe	500		$0,1 \times 10 = 1$	500
10% HS; 30% GMS, 60% andere; 3 % ätzende Stoffe	300		1 (weil Menge < 10%)	300
20% HS, 30% GMS; 50% andere; 15% ätzende Stoffe	425		$0,15 \times 10 = 1,5$	637,5
50% HS, 20% GMS; 30% andere; 30% ätzende Stoffe	675		$0,3 \times 10 = 3$	2025

In der Berechnung oben vorgestellter Beispiele wurde vereinfachend angenommen, dass nur 1 Komponente zu bewerten wäre. Tatsächlich kann die Kalkulation zweistufig erfolgen:

a) Berechnung der Gefährdungszahl für die einzelne Komponente eines Gemischs (Harz, Härter),

b) für das Gesamtgemisch:

Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verhältnisse (z.B. 3:1; Komponenten Harz: Härter) ändern sich die jeweiligen Mengenangaben entsprechend.

Es ist zu beachten, dass die Umrechnung von der Einzelkomponente auf den Beitrag im Gesamtgemisch nicht immer linear verläuft, weil z.B. der Verstärker noch größer 1 bezogen auf die Einzelkomponente sein kann, dann jedoch nicht einbezogen wird, wenn im Gesamtgemisch der Anteil ätzender Stoffe < 10% ist. Ebenfalls kann in der Einzelkomponente die Konzentration sensibilisierender Stoffe > 40% sein mit der Folge, dass ein Teil mit sehr schwacher Steigung eingerechnet wird, während im Gesamtgemisch dann nur der Beitrag mit dem höheren Wirkfaktor eingeht.

8.3.4 Bildung von Gefährdungsklassen

Bei kleinen Unterschieden in der Gesamtgefährdungszahl ist eine zusätzliche Vereinbarung erforderlich, wenn diese Differenzen als „signifikant“ bewertet werden, d.h. tatsächlich im

Anbetracht der Unsicherheiten der Einzelannahmen und des Konventionscharakters dieser Berechnungen als ausreichend angesehen werden, um handlungsrelevant zu werden. Die folgende **Abbildung 22** zeigt eine mögliche Unterteilung in „Bänder“, in denen jeweils keine gravierenden Unterschiede angenommen werden, während bei Überschreiten der Bandgrenzen möglicherweise Handlungsbedarf angenommen werden soll. Die Grenzen und die Breite der Bänder sind noch zu diskutieren.



Abbildung 22: Klassenzuordnung mit Gefährdungszahl für Gesamtbewertung (Beispiel)

8.3.5 Beispiel

In den folgenden **Tabelle 38** sind zwei Beispiele für Gemische berechnet, zu denen die Angaben tatsächlich Sicherheitsdatenblättern entstammen und die sich im Ergebnis deutlich unterscheiden.

8.3.6 Diskussion

Die vorgestellte Bewertungsmethode für Gemische stellt ein Rohkonzept dar, das nach Berechnung mehrerer realistischer Beispiele weiterzuentwickeln ist. Die bisherigen Rechnungen zeigen die grundsätzliche Machbarkeit. Die spezifische Funktion im Rahmen regulatorischer Konsequenzen ist noch festzulegen und nicht Gegenstand des Forschungsprojekts.

8.4 EIS- Hintergrund

8.4.1 Funktion und mögliche Themen

Der Abschnitt „Hintergrundinformationen“ innerhalb von EIS ist dafür vorgesehen, weitere Hilfestellungen zur Umsetzung des Arbeitsschutzes beim Umgang mit Epoxidharzsystemen zu liefern. Diese können sich zum Beispiel beziehen auf:

- die sachgemäße Interpretation der Daten der EIS-Liste,
- die Diskussion anderer gesundheitlich relevanter Wirkungen von Epoxidharzinhaltsstoffen und deren Relevanz für beruflich gegenüber Epoxidharzen exponierten Personen (z.B. Diskussion der Relevanz von „Bisphenol-A“ in Epoxidharzen unabhängig von der sensibilisierenden Wirkung),
- die sachgerechte Interpretation der Ergebnisse der EIS-Gemischebewertung,
- Hinweise zur Bewertung von besonderen Produkten (z.B. Epoxidharz-Dispersionen, Baumarkt-2-Komponentensystemen wie „powerkits“, etc.)
- technische und organisatorische Maßnahmen zur Vermeidung der Sensibilisierung durch Epoxidharzinhaltsstoffe,
- Hinweise zum Verständnis der Allergieentstehung für Nichtmediziner,
- Diskussion zur Frage, ob neben dem Hautkontakt auch luftgetragene Belastung mit bestimmten Epoxidharzinhaltsstoffen zur Sensibilisierung führen kann.

Im Rahmen dieses Projekts wurde als Beispiel ein Beitrag erarbeitet, der Erläuterungen zum Verständnis von Kreuzallergien durch Epoxidharzinhaltsstoffe liefert (Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

8.4.2 Kreuzallergien durch Komponenten von Epoxidharzsystemen

Autor: Johannes Geier, Informationsverbund Dermatologischer Kliniken (IVDK)

Eine Kontaktallergie (Typ IV-Sensibilisierung) ist eine überschießende Fehlfunktion des Immunsystems, die sich gegen einen Stoff richtet, mit dem Hautkontakt besteht, und der über die Haut aufgenommen wird. Solche Sensibilisierungen sind erstens stoff-spezifisch, richten sich also gegen *ein* bestimmtes Allergen, und zweitens erworben, also nicht

angeboren. Das bedeutet, es muss zunächst eine Sensibilisierungsphase stattfinden; erst bei erneutem Kontakt mit dem Allergen wird dann eine allergische Reaktion ausgelöst.

Das, was gemeinhin als „Kontaktallergen“ bezeichnet wird, ist im immunologischen Sinne ein „Hapten“. In der Regel ist dies eine niedermolekulare Substanz. Das Hapten dringt durch die oberste Schicht der Haut und reagiert in der Haut mit Proteinen. Der Komplex aus Hapten und Protein wiederum wird von dendritischen Zellen in der Haut prozessiert und später den (zuvor in der Phase der Sensibilisierung) spezifisch geprägten T-Lymphozyten präsentiert. Diese wiederum lösen eine Entzündungsreaktion aus, die sich klinisch als allergisches Kontaktekzem äußert [Rustemeyer et al. 2011].

Häufig reagiert ein betroffener Patient nicht nur auf einen einzigen, sondern auf zwei oder mehrere Stoffe allergisch. In solchen Fällen stellt sich die Frage, ob voneinander unabhängige, multiple Sensibilisierungen vorliegen, oder ob die Sensibilisierungen durch eine so genannte Kreuzallergie miteinander in Zusammenhang stehen.

Kreuzallergie („cross sensitization“)

Wichtige Voraussetzungen für eine Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Allergenen sind eine strukturelle Ähnlichkeit, eine ähnliche chemische Reaktivität und eine ähnliche räumliche Konfiguration. Die Ursachen für Kreuzallergien können auf verschiedenen Ebenen der Entstehung einer kontaktallergischen Reaktion liegen [Uter et al. 2007].

Ein Hapten kann einem anderen Hapten, gegen das der betroffene Patient bereits allergisch ist, so ähnlich sein, dass es dieselbe allergische Reaktion auslöst – obwohl der Mensch zuvor noch nie Kontakt damit hatte. Die Ähnlichkeit kann auch auf der Ebene der Hapten-Protein-Komplexe vorliegen.

Ein Hapten kann durch eine chemische Reaktion (z.B. Oxidation auf der Haut oder in der Haut) zu einem anderen Hapten (oder einem diesem Hapten ähnlichen Stoff) umgewandelt werden, gegen das der betroffene Patient bereits allergisch ist.

Dasselbe kann auch durch aktive Metabolisierung, z.B. durch körpereigene Enzyme, passieren.

Der wissenschaftliche Nachweis, dass eine Kreuzallergie zwischen zwei Substanzen besteht, wird durch experimentelle Untersuchungen geführt, in denen man Tiere (in der Regel Meerschweinchen) gegen einen Stoff sensibilisiert, und dann überprüft, ob sie auf einen anderen Stoff, mit dem sie zuvor keinen Kontakt hatten (also das verdächtige Kreuzallergen), allergisch reagieren [Pontén et al. 2002].

Das Vorliegen einer Kreuzallergie beim Menschen kann man durch Untersuchungen (Lymphozyten-Stimulations-Tests) an T-Zell-Klonen von sensibilisierten Patienten beweisen [Muris et al. 2009, Spoerri et al. 2015]. Solche Untersuchungen sind jedoch sehr aufwändig und werden nur im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen, nicht aber in der Routine-Diagnostik durchgeführt.

Im klinischen Alltag muss man bei gleichzeitig auftretenden allergischen Reaktionen immer auch in Betracht ziehen, dass multiple (voneinander unabhängige) Sensibilisierungen vorliegen können, weil die Allergen-Exposition jedes einzelnen Menschen vielfältig sein kann. Epidemiologische Daten zur Häufigkeit von Ko-Sensibilisierungen können jedoch wertvolle Hinweise geben, insbesondere wenn zusätzlich Daten zur Exposition vorliegen.

Kopplungsallergie („concomitant sensitization“)

Von der immunologischen Kreuzallergie abzugrenzen ist die so genannte Kopplungsallergie oder Ko-Sensibilisierung. Dieser Begriff beschreibt die Sensibilisierung gegen zwei verschiedene Stoffe, die durch gleichzeitige Exposition gegenüber beiden Stoffen erworben wird [Uter et al. 2007].

Ein allgemeines Beispiel für die Kopplungsallergie ist die gleichzeitige Sensibilisierung gegen Nickel und Kobalt. Da metallisches Nickel, z.B. im Modeschmuck, fast immer auch Kobalt enthält, besteht in der Regel eine Ko-Exposition, wodurch der oder die Betroffene mehr oder weniger gleichzeitig gegen Nickel und Kobalt sensibilisiert werden kann.

Im Bereich der Epoxidharzsysteme gibt es Kopplungsallergien z.B. gegen Epoxidharze auf Basis von Bisphenol A-diglycidylether (DGEBA) und Bisphenol F-diglycidylether (DGEBF), da diese in kalthärtenden Epoxidharzsystemen wegen der besseren Verarbeitbarkeit bei niedrigen Temperaturen in der Regel zusammen eingesetzt werden.

Auch bei den gleichzeitig erworbenen Sensibilisierungen gegen Harze, Reaktivverdünner und/oder Härter, die chemisch *nicht* miteinander verwandt sind, handelt es sich um Kopplungsallergien durch Ko-Exposition.

Auf Kopplungsallergien wird im Folgenden nicht weiter eingegangen.

Kreuzreaktionen zwischen Epoxidharzen

Mono- und Oligomere des DGEBA sind die wichtigsten Allergene in Epoxidharzsystemen. Etwas weniger häufig werden Sensibilisierungen gegen Mono- und Oligomere der drei Isomere des DGEBF beobachtet. Pontén und Mitarbeiter haben im Tierversuch immunologische Kreuzreaktionen zwischen DGEBA und p,p'-DGEBF, DGEBA und o,p'-DGEBF, sowie p,p'-DGEBF und o,p'-DGEBF beobachtet [Pontén et al. 2002].

In etlichen klinischen Untersuchungen an betroffenen Patienten wurde eine hohe Konkordanz allergischer Reaktionen auf DGEBA- und DGEBF-Harze festgestellt, was ebenfalls im Sinne immunologischer Kreuzreaktionen gedeutet werden kann [Aalto-Korte et al. 2014a, Geier et al. 2004, Pontén und Bruze 2001, Pontén et al. 2004a]. Allerdings ist – wie bereits erwähnt – davon auszugehen, dass im beruflichen Bereich meist eine gleichzeitige Exposition gegenüber beiden Harzen vorliegt, die auch zu immunologisch voneinander unabhängigen Sensibilisierungen gegen beide Harze führen kann.

Kreuzreaktionen zwischen DGEBA-Epoxidharz und Phenylglycidylether

Auch Kreuzreaktionen zwischen DGEBA-Harz und Phenylglycidylether (PGE) sind in Tierversuchen nachgewiesen worden. Pontén und Mitarbeiter konnten bei Meerschweinchen, die gegen DGEBA-Harz sensibilisiert worden waren, mit PGE eine allergische Reaktion auslösen [Pontén et al. 2004b]. Die Strukturen von DGEBA und PGE sind in Abbildung 1 dargestellt; die Ähnlichkeiten sind leicht erkennbar.

Dies konnte durch klinische Untersuchungen an Patienten mit Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz und PGE bestätigt werden [Pontén et al. 2008]. Insgesamt gibt es nur wenige Patienten mit einer Sensibilisierung gegen PGE, die nicht auch gegen DGEBA-Harz sensibilisiert sind.

Primäre Sensibilisierungen gegen PGE dürften heutzutage selten sein, da PGE praktisch nicht mehr in Epoxidharzsystemen verwendet wird [Aalto-Korte et al. 2015, Geier et al. 2016].

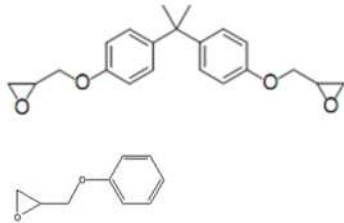


Abbildung 2:

Strukturformeln von Bisphenol A-diglycidylether (DGEBA, oben) und Phenylglycidylether (PGE, unten).

Kreuzreaktionen zwischen Reaktivverdünnern

Aromatische Glycidylether

Allergische Reaktionen auf Cresylglycidylether (CGE) sind häufig beschrieben worden, meist gemeinsam mit Reaktionen auf PGE. Wegen der engen strukturellen Verwandtschaft zwischen PGE und CGE (siehe Abbildung 2) ist anzunehmen, dass auch hier immunologische Kreuzreaktionen vorkommen, auch wenn hierzu keine tierexperimentellen Daten vorliegen. CGE wird – im Gegensatz zum PGE – verbreitet in Epoxidharzsystemen eingesetzt. Es ist also anzunehmen, dass die Patienten sich primär gegen CGE sensibilisieren und dann sekundär auch auf PGE allergisch reagieren – sofern nicht eine Sensibilisierung gegen PGE bereits auf dem Boden einer allergischen Kreuzreaktion bei primärer Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz bedingt ist [Aalto-Korte et al. 2015, Geier et al. 2016].

Gleichzeitige allergische Reaktionen auf die aromatischen Glycidylether PGE und/oder CGE einerseits und p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE) andererseits treten ebenfalls mit einer gewissen Häufigkeit auf. Allerdings liegen die Quoten gleichzeitig beobachteter Reaktionen nicht in einem Bereich, wie man ihn erwarten würde, wenn *grundsätzlich immer* immunologische Kreuzreaktionen vorlägen. Daher kann man davon ausgehen, dass wahrscheinlich in einigen Fällen in der Tat Kreuzsensibilisierungen bestehen, wahrscheinlich aber die Mehrheit der gleichzeitig auftretenden Reaktion durch Ko-Exposition oder konsekutive Exposition gegenüber diesen Reaktivverdünnern bedingt ist. Vieles spricht dafür, dass PTBPGE ein eigenständiges Allergen ist, und Sensibilisierungen gegen PTBPGE bei weitem nicht immer Ausdruck einer immunologischen Kreuzreaktion bei primärer Sensibilisierung gegen einen anderen aromatischen Glycidylether sind [Aalto-Korte et al. 2015, Geier et al. 2016].

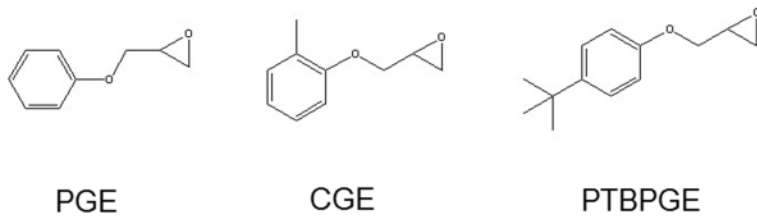


Abbildung 2:

Strukturformeln von Phenylglycidylether (PGE), Cresylglycidylether (CGE) und p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE).

Aliphatische Glycidylether

Unter den Reaktivverdünnern sind 1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE) und 1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE) die häufigsten Allergene, mit einer hohen Quote konkordanter Reaktionen. Auch wenn keine tierexperimentellen Studien zur Kreuzsensibilisierung mit 1,6-HDDGE und 1,4-BDDGE vorliegen, so erscheint es angesichts der engen chemisch-strukturellen Verwandtschaft zwischen den beiden Molekülen (siehe Abbildung 3) doch wahrscheinlich, dass die konkordanten allergischen Reaktionen beim Menschen durch immunologische Kreuzreaktionen bedingt sind [Geier et al. 2004, Geier 2010, Geier et al. 2016].

In der IVDK-Datenanalyse, die im Rahmen des Forschungsvorhabens FP-0324 vorgenommen wurde, stellte sich heraus, dass 83% der gegen Butylglycidylether sensibilisierten Patienten auch auf 1,4-BDDGE reagierten (in umgekehrter Richtung: 26%), was zu der Annahme führte, dass möglicher Weise ein Abbauprodukt von 1,4-BDDGE für diese Form von Kreuzreaktionen verantwortlich ist, und sich daher auch die vergleichsweise hohe Reaktionsfrequenz auf den recht selten in Epoxidharzsystemen eingesetzten Butylglycidylether erklärt [Geier et al. 2016].

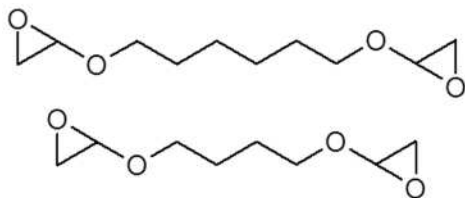


Abbildung 3:

Strukturformeln von 1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE, oben) und 1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE, unten).

Kreuzreaktionen zwischen Härtern

Unter den häufig eingesetzten und/oder oft als Allergen identifizierten Härtern gibt es nur wenige, die eine enge chemisch-strukturelle Verwandtschaft aufweisen. Daher sind immunologische Kreuzreaktionen hier von vornherein eher nicht zu erwarten.

Allerdings gibt es unter den Epoxidharz-Härtern einige wenige strukturell verwandte aliphatische Amine. Dazu gehören Ethylendiamin, Diethylentriamin, Triethyltetramin und Tetraethylenpentamin. Kreuzallergien zwischen Ethylendiamin, Diethylentriamin und/oder Triethyltetramin wurden aufgrund gleichzeitig auftretender Reaktionen im Epikutantest diskutiert, können aber anhand der vorliegenden klinisch-epidemiologischen Daten nicht als gesichert angesehen werden [Aalto-Korte et al. 2014b, Geier et al. 2016]. Tierexperimentelle Untersuchungen zu Kreuzreaktionen zwischen diesen Härtern liegen nicht vor.

Kreuzreaktionen zwischen Diisocyanaten und ihren korrespondierenden Aminen

Isocyanate sind sehr reaktionsfreudige Verbindungen, die mit Wasser rasch zu ihren korrespondierenden Aminen reagieren. Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat (Methyldiphenylisocyanat; MDI) ist sowohl ein Atemwegsallergen als auch ein Kontaktallergen. Da MDI bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit, wie dies auf der Haut gegeben ist, zu 4,4'-Diaminodiphenylmethan (Methyldianilin; MDA) reagiert (siehe Abbildung 4), ist bei einer Exposition gegenüber MDI immer auch eine Exposition gegenüber MDA gegeben, die zu einer entsprechenden Sensibilisierung führen kann. Außerdem kann MDI auch auf einem anderen Weg auf und in der Haut zu MDA umgewandelt werden. Daher wird MDA auch als Surrogat-Epikutantestsubstanz für die Diagnostik bei Verdacht auf Kontaktallergie gegen MDI empfohlen [Frick-Engfeldt et al. 2007].

Eine ähnliche Beziehung ist zwischen Isophorondiisocyanat (IPDI) und Isophorondiamin (IPDA) anzunehmen, wenngleich nicht im selben Maße untersucht und bewiesen wie im Falle von MDI und MDA.

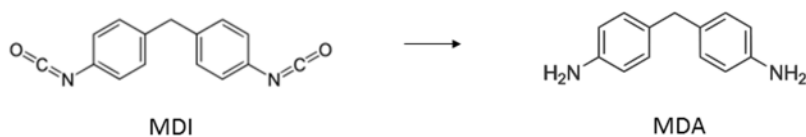


Abbildung 4:

Strukturformeln von Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat (Methyldiphenylisocyanat; MDI) und 4,4'-Diaminodiphenylmethan (Methyldianilin; MDA).

„Parastoff-Allergie“ als Ursache einer Sensibilisierung gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan

Bei einer Sensibilisierung gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan (Methyldianilin; MDA) kann es sich – neben der beschriebenen Sensibilisierung durch Exposition gegenüber MDI – auch um eine originäre Sensibilisierung gegen diese Verbindung handeln. Es kann aber auch eine

immunologische Kreuzreaktion bei primärer Sensibilisierung gegen andere in Para-Stellung di-substituierte aromatische Amine (so genannte „Parastoffe“), insbesondere gegen das in Haarfarben enthaltene p-Phenylendiamin, vorliegen [Uter et al. 2002]. Die Ähnlichkeit der chemischen Strukturen geht aus Abbildung 5 hervor.

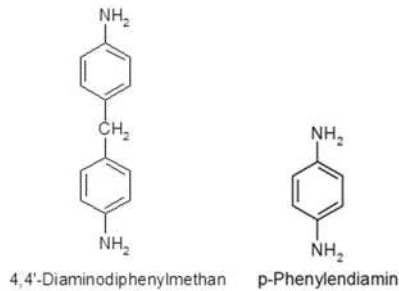


Abbildung 5:

Strukturformeln von 4,4'-Diaminodiphenylmethan und p-Phenylendiamin.

Auswirkung auf die Beurteilung von Epoxidharzsystem-Komponenten

Die Erkenntnisse zu möglichen Kreuzsensibilisierungen zwischen Bestandteilen von Epoxidharzsystemen sind nicht in die Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke (GMS, HS, SHS) der einzelnen Komponenten eingeflossen. Ebenso wurde bei der Bewertung als seltenes oder häufiges Allergen (S, H) nicht differenziert, ob die Sensibilisierung durch den Stoff selbst oder durch eine Kreuzallergie zustande kommt. In den jeweiligen Abschnitten zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen wurden mögliche Kreuzallergien jedoch dargestellt, weil sie sowohl für die Formulierung von Epoxidharzsystemen als auch für die Diagnostik bei Verdacht auf Kontaktallergie von Bedeutung sind. Auch in die Bewertung von Gemischen fließen die Erkenntnisse zu Kreuzsensibilisierungen als Randbedingungen ein.

Literatur

Aalto-Korte K, Suuronen K, Kuuliala O, Henriks-Eckerman ML, Jolanki R. Screening occupational contact allergy to bisphenol F epoxy resin. *Contact Dermatitis* 2014a; 71: 138-144

Aalto-Korte K, Suuronen K, Kuuliala O, Henriks-Eckerman M-L, Jolanki R. Contact allergy to epoxy hardeners. *Contact Dermatitis* 2014b; 71: 145-153

Aalto-Korte K, Kuuliala O, Henriks-Eckerman M-L, Suuronen K. Contact allergy to reactive diluents and related aliphatic epoxy resins. *Contact Dermatitis* 2015; 72: 387-397

Frick-Engfeldt M, Isaksson M, Zimerson E, Bruze M. How to optimize patch testing with diphenylmethane diisocyanate. *Contact Dermatitis* 2007; 57: 138-151

Geier J, Lessmann H, Hillen U, Jappe U, Dickel H, Koch P, Frosch PJ, Schnuch A, Uter W. An attempt to improve diagnostics of contact allergy due to epoxy resin systems. First results of the multicentre study EPOX 2002. *Contact Dermatitis* 2004; 51: 263-272

Geier J. Kontaktallergie gegen Epoxidharze aus der Perspektive des Informationsverbundes Dermatologischer Kliniken (IVDK) und der Deutschen Kontaktallergie-Gruppe (DKG). *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 2010; 70: 7-9

Geier J, Lessmann H, Hillen U, Skudlik C, Jappe U. Sensitization to reactive diluents and hardeners in epoxy resin systems. IVDK data 2002 – 2011. Part II: concomitant reactions. *Contact Dermatitis* 2016; 74: 94-101

Muris J, Kleverlaan CJ, Feilzer AJ, Valentine-Thon E. Reactivity to sodium tetrachloropalladate (Na₂[PdCl₄]) compared to PdCl₂ and NiCl₂ in lymphocyte proliferation tests. *Allergy* 2009; 64: 1152-1156

Pontén A, Bruze M. Contact allergy to epoxy resin based on diglycidyl ether of bisphenol F. *Contact Dermatitis* 2001; 44: 98-99

Pontén A, Zimerson E, Sörensen Ö, Bruze M. Sensitizing capacity and cross-reaction pattern of the isomers of diglycidyl ether of bisphenol F in the guinea pig. *Contact Dermatitis* 2002; 47: 293-298

Pontén A, Zimerson E, Bruze M. Contact allergy to the isomers of diglycidyl ether of bisphenol F. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 2004a; 84: 12-17

Pontén A, Zimerson E, Bruze M. Sensitizing capacity and cross-reactivity of phenyl glycidyl ether. *Contact Dermatitis* 2004b; 50: 166

Pontén A, Zimerson E, Bruze M. Can simultaneous contact allergies to phenyl glycidyl ether and epoxy resins of the bisphenol A/F-types be explained by contamination of the epoxy resins? *Contact Dermatitis* 2008; 59: 273-279

Rustemeyer T, van Hoogstraten IMW, von Blomberg BME, Gibbs S, Scheper RJ. Mechanisms of irritant and allergic contact dermatitis. In: Johansen JD, Frosch PJ, Lepoittevin JP (eds.): *Contact Dermatitis*, 5th Edition, S. 43-90, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2011

Spoerri I, Scherer K, Michel S, Link S, Bircher AJ, Heijnen IA. Detection of nickel and palladium contact hypersensitivity by a flow cytometric lymphocyte proliferation test. *Allergy* 2015; 70: 323-327

Uter W, Lessmann H, Geier J, Becker D, Fuchs Th, Richter G. The spectrum of allergic (cross-)sensitivity in clinical patch testing with 'para amino' compounds. *Allergy* 2002; 57: 319-322

Uter W, Lessmann H, Rothe A. Kreuzreaktionen / "Gruppenallergie". In: Fuchs T, Aberer W (Hrsg.): *Kontaktexzem*, 2. Auflage, S. 369-393. Dustri-Verlag München-Deisenhofen, 2007

9 DOKUMENTATION DER BEGLEITKREISDISKUSSIONEN

9.1 Einführung

Das Projekt (wie auch das Vorprojekt) wurden durch einen Begleitkreis unterstützt, mit dem Absprachen zur Stoffauswahl, Testung und zur Rankingmethode erfolgten und mit dem (Zwischen-) Ergebnisse intensiv diskutiert werden konnten. Der Begleitkreis traf sich im Laufe des Projekts an drei Terminen. Die folgenden Abschnitte dokumentieren die Protokolle der Begleitkreissitzungen. Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** enthält eine Liste der Begleitkreisteilnehmer.

9.2 Begleitkreisprotokoll Sitzung am 9. September 2015

Teilnehmer:

Astrid Antes, AUVA; Maren Beth-Hübner, BGRCI; Willy Frei, SUVA; Johannes Geier, IVDK; Martin Haussauer, FoBiG; Karin Heine, FoBiG; Fritz Kalberlah, FoBiG; Wolfgang Karl, MC-Bauchemie; Klaus Kersting, BG Bau; Achim Klippstein, Air Products; Uta Köhler, Unfallkasse NRW; Stefanie Labs, BG ETEM; Sabine Lindner, Plastics Europe; Michael Schmidt, DGUV; Marco Steinhausen, IFA-DGUV; Corinne, Ziegler, BG Bau

Tagesordnung

10:30 Begrüßung (Reinhold Rühl)

10:45-11:00h	Vorstellungsrunde	
11:00-11:20h	Rückblick: das Vorläuferprojekt	Fritz Kalberlah
11:20-11:40h	Epoxidharzallergie: aktueller Stand aus allergologischer Sicht	Johannes Geier
11:40-11:55h	Andere Projekte zu Epoxidharzen	Reinhold Rühl
13:00-13:20h	Gegenstand des neuen Projekts nach derzeitiger Planung	Fritz Kalberlah
13:20-13:40h	Epoxidharzsysteme und ihre Anwendung; notwendige technische Spezifizierungen	N.N.
13:40-14:00h	Stoffliste; derzeitige Stoffe; geplante Ergänzungen; spezielle Rezepturen und Einzelstoffe	Fritz Kalberlah
14:00-14:15h	Neuentwicklungen zur Bewertungsmethodik und bei Testsystemen	Fritz Kalberlah/ Martin Hassauer
14:15-14:30h	Können <i>in vitro</i> Tests helfen?	N.N.

14:30-14:40h	<u>Epoxidharzinformationssystem (EIS):</u> Erfahrungen aus dem KSS-Bereich	Fritz Kalberlah
14:40-15:00h	<u>Epoxidharzinformationssystem (EIS):</u> Wie könnte eine Epoxiliste aussehen? Diskussion zur Liste	Klaus Kersting
15:00-15:10h	Zeitplan des Projekts	Fritz Kalberlah
15:10-15:30h	Verschiedenes	Klaus Kersting

Diskussionen

Epoxidharzallergie - aktueller Stand aus allergologischer Sicht (J. Geier)

- vgl. Folien (anbei)
- Allergien auf Epoxidharzen basieren auf bis zu 80 % auf Härtern und auf bis zu 40 % auf Reaktivverdünnern, also nicht auf DGEBA. Speziell relevant: Diethylentriamin (DETA)
- In Finnland häufiges Allergen: 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (CAS-Nr. 90-72-2), wird in Deutschland nicht getestet

Anmerkung R.. Rühl: Neue Substanzen für Epikutantests sind zulassungspflichtig, sehr aufwändige Prozedur

Epoxidharzsysteme und ihre Anwendung - notwendige technische Spezifizierungen (W. Karl/ A. Klippstein)

- Bei kurzer Aushärtezeit sind Harze wegen höherer Reaktivität toxischer
- je poröser der Untergrund, umso flüssiger müssen Harze sein; bereits bei Polymerisierungsgrad von 0,2 sind Harze so viskos, dass sie nicht mehr für Betonbeschichtungen verwendet werden können
- zur Blechbeschichtung werden meist hochmolekulare Harze verwendet (unterschiedliche Bewertung der Anwesenden)
- Nicht immer ist eine klare Zuordnung bestimmter Harztypen zu bestimmten Verwendungszwecken möglich
- Die höchste Produktdiversität findet sich im Baubereich (mehrere 100 Produkte)

S

Epoxidharzsysteme und ihre Anwendung – relevante Expositionsbereiche

- Fertigungsprobleme bei Windkraftanlagen erfordern viel händische Nacharbeit
- Die höchsten Fallzahlen an Allergien in Österreich finden sich bei der Flug-/Raumfahrtindustrie (A. Antes)

- Ursache vermutlich überwiegend Compositfertigung, mit hohem Monomeranteilen in den Harzen (A. Klippstein)
- Speziell bei Restauratoren oft unsachgemäßer Umgang ohne ausreichende Schutzausrüstung beobachtet

Stoffliste - derzeitige Stoffe; geplante Ergänzungen; spezielle Rezepturen und Einzelstoffe

- Anmerkungen zu Pattex-Knetmasse: die gesundheitlichen Bedenken gelten für alle derartigen Knetmassen (generell auch im Hobbybereich verwendet)
- Klarstellung: Die als vorgehärteten Epoxidharze bezeichneten Komponenten sind teilpolymerisierte Härter, welche aus Gründen der Viskosität aus 30-40 % monomeren Aminen bestehen, also nicht isoliert erhältlich sind. Zudem ist immer Zusatz von DGEBA nötig. Insofern bietet sich kein klarer Vorteil gegenüber konventionellen Systemen.
- Auf Isophorondiamin basierender polymerisierter Härter wird für Testzwecke zur Verfügung gestellt, ein Vergleich mit IPD wäre sinnvoll (W.Karl)
- Andere Harztypen (z.B. cycloaliphatische Harze) scheinen hauptsächlich für Nischenanwendungen relevant

Streichlisten für die Auswahl zu testender Stoffe in FP 384 (Ausklammern von nicht praxisrelevanten Substanzen, nach Diskussion)

S o.	S AS-Nr.	S Substanz	S Anmerkung/E rklärung
(1)	138-86-3	Dipenten (Limonen)	In Epoxidharzsystemen verwendete Substanzen, die gekennzeichnet sind mit R43/H317 aber ohne schwerwiegendere Eigenschaften (kanz, repro, ätzend) und die 2012 noch nicht bewertet wurden
2	20882-04-6	[2-[(2-methyl-1-oxoallyl)oxy]ethyl]hydrogen succinate	
3	4246-51-9	3,3'-oxybis(ethyleneoxy)bis(propylamine)	
4	39817-09-9	2,2'-[methylenebis(phenyleneoxymethylene)]bisoxirane	
5	2372-82-9	N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin	Von BG Bau vorgeschlagen: Listung auf Basis des Vorkommens in Härter oder RV; bis auf Piperazin nicht R43 gekennzeichnet, womöglich keine Testung auf Sensibilisierung erfolgt da als Ätzend (R34/1B bzw. R35/1A) eingestuft (column 2 of REACH)
6	919-30-2	3-Aminopropyltriethoxysilan „niedrige Priorität“	
7	288-32-4	1,3-Diaza-2,4-cyclopentadien (Imidazol)	
8	71074-89-0	Bis[(dimethylamino)methyl]phenol	
9	90529-77-4 / 25038-04-4	Propantriolglycidylether (1,2,3-Propanetriol, glycidyl ethers bzw. 1,2,3-Propanetriol,	

		polymer with 2-(chloromethyl)oxirane)	
10	110-85-0	Piperazin	s.o. aber als R43 gekennzeichnet
(11)	302-01-2	Hydrazin	Epoxidharzhärter in Japan, Kanzerogen
12	98-94-2	N,N-dimethyl-cyclohexanamine „Katalysator“	corrosive
13	106-92-3	allyl 2,3-epoxypropyl ether)	R43
14	1003-14-1	Propyloxirane	nicht R43, vermutlich nicht selbst Epoxidharzinhaltsstoff
15	2386-87-0	7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptane-3-carboxylate	R43
16	28768-32-3	4,4'-methylenebis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)aniline]	R43
17		Epoxidharzmonomere	O'Boyle et.al., 2014

Neue Stoffe aus FP-0324 (Anregung Industrie)

Diese Stoffliste wurde der Vollständigkeit halber aufgeführt. Nachdem die Substanzen bereits im Projekt FP-0324 diskutiert wurden, werden sie nicht für eine weitere Bewertung und/oder Testung in Betracht gezogen.

Cas-Nr.	Substanz	FoBiG	IVDK
9046-10-0	Poly[oxy(methyl-1,2-ethanediyl)], ?-(2-aminomethylethyl)-?-(2-aminomethylethoxy)	-	U
	PolyPropylenEthyleneDiamin	-	U
37189-83-6	12-Octadecadienoic acid (9Z,12Z)-, dimer, polymer with N-(2-aminoethyl)-1,2-ethanediamine	-	U
6864-37-5	2,2'-dimethyl-4,4'-methylenebis(cyclohexylamine)	-	U
	Polyaminoamido-imidazolines	-	U
	Asparaginsäureester	-	-
55492-52-9	Bisphenol F-Epoxidharz	-	H

Neue Stoffe für FP-0384 (Liste Dt. Bauchemie)

CAS-Nr.	Substanz	R-Sätze	H-Sätze
1173092-74-4	Carbomonocyclisch-alkyliertes Gemisch aus Poly-Aza-Alkanen, hydriert nicht registriert, Struktur unklar	34-43	314-317
135108-88-2	Formaldehyd, Polymer mit Benzenamin, hydriert siehe Anmerkungen oben	22-34-43-48/22-52/53	302-314-317-373-412
68391-18-4	4,4'-Isopropylidendiphenol, oligomere Reaktionsprodukte mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan, Reaktionsprodukte mit 2-Piperazin 1-ylethylamin	21/22-34-43-52/53	302-312-314-317-412
158885-14-4	4,4'-Isopropylidendiphenol, oligomere Reaktionsprodukte mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 1,3-Cyclohexandimethanamin		302-312-314-317-412
113930-69-1	4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und m-phenylenbis(methylamin)	34-43-51/53	314-317-411
38294-64-3	4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin	34-43-52/53	314-317-412

Nachträgliche Anmerkung: Liste wurde Anfang Oktober 2015 finalisiert

Auswahl der Testsysteme für FP384

- LLNA-Testung bietet die aussagekräftigsten Daten bei moderaten Preisen (BASF-Einschätzung)
- Aceton als Lösemittel ungeeignet für alle Amine wg. Schiff-Basenbildung; generell unsicher (W.Karl; M.Steinhausen)
- In der Zukunft wird die Vergleichsbasis hauptsächlich aus *in vitro* Daten bestehen (Tierschutzthemaik), daher: LLNA soll nur für einzelne, begründete Substanzfälle (Ausnahme) verwendet werden, sonst *in vitro* Testungen, bei Substanzreihen soll vor allem QSAR verwendet werden (R. Rühl; F. Kalberlah).

9.3 Begleitkreisprotokoll Sitzung am 15. Juni 2016

KURZPROTOKOLL DER SITZUNG DES BEGLEITKREIS DES FORSCHUNGSPROJEKTES FP-0384, FRANKFURT, 15.6.2016

Die von den Teilnehmern vorgestellten Ergebnisse liegen als Foliensätze vor.

Zentrale Punkte der Vorstellung und Diskussion sind als Punkte in diesem Kurzprotokoll vermerkt.

Einige Merkmale:

Humandaten

Herr Geier hob in seinem Vortrag hervor, dass zweifelsfrei in mehreren Fällen Allergien gegen Einzelkomponenten von Epoxidharzsystemen nachgewiesen wurden, ohne dass gleichzeitig Sensibilisierung gegen das Epoxidharz vorlag.

Ergebnisse der Testungen und vorläufiges Ranking

Es ist mit Herrn Karl (nicht anwesend) zu klären, welchen Reinheitsgrad der in den Testungen verwendete oligomerisierte Härter (IPD-Polymer DBC-15-01, CAS-Nr. 38294-64-3) aufwies (Rohprodukt mit 10-30 % Isophoronanteil oder aufgereinigtes Produkt), um das Ergebnis der *in vitro* Testungen besser einordnen zu können.

Auf die Nachfrage wg. des verwendeten Vehikels in den *in vitro* Testungen mit zellulären Testsystemen ist zu ergänzen: Im KeratinoSens™ wurde gemäß der OECD guideline DMSO, also nicht Aceton verwendet.

Frau Emminger hob hervor, dass die modifizierten Harzkomponenten (O'Boyle et al. 2014) in der Herstellung teurer sind als die herkömmlichen Produkte und sich speziell das cycloaliphatische Harz nur für Heisshärtung in Gegenwart eines Katalysators eignet. Dennoch scheinen chemische Modifikationen ein prinzipiell geeigneter Ansatz, um die sensibilisierende Wirkstärke reaktiver Komponenten zu verringern (siehe z.B. oligomerisierte Härter, Produkt von Herrn Karl in den Tests).

Herr Kalberlah regte an, dass das Thema Dispersions- und Emulsionsharze mit Herrn Klippstein und Herrn Kersting vertieft wird, um weitere Informationen zu diesen modifizierten Systemen mit möglicherweise geringerer Wirkstärke der Sensibilisierung zu erhalten. In diesem Zusammenhang soll auch versucht werden

a) Informationen anderer Hersteller zu erhalten

b) zu klären, ob bzw. wie gebrauchsfertige Mischungen *in vitro* und ggf. *in vivo* zu testen wären, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten und mit den Ergebnissen der Einzelkomponenten zu vergleichen. Dies ist wäre allem von Interesse im Hinblick auf die

Wirkstärke von Systemen mit reduzierten Gehalten der hinsichtlich der sensibilisierenden Wirkung kritischen Komponenten. Außerdem könnte hiermit der Einfluss bei Verwendung von Lösemitteln oder lösemittelartigen Additiven in der Formulierung eventuell besser eingeschätzt werden.

Weitere Termine

Für die letzte Sitzung des Begleitkreises wurde der Zeitraum Mitte Oktober-Anfang November avisiert, in einer Umfrage muss der konkrete Termin noch konkretisiert werden.

Das Thema der letzten Begleitkreissitzung wird die Vorstellung der finalen Rankingergebnisse für die Inhaltsstoffe sein, aber vor allem soll die mögliche Struktur des angedachten Epoxidharzinformationssystems (sog. EIS-Liste) diskutiert werden. Von den Projektverantwortlichen wird ein Vorschlag erarbeitet, der jedoch die Kreativität und das Zutun aller im Begleitkreis beteiligter benötigt, um eine für die Praxis relevante Liste zu erstellen.

Herr Pieringer berichtete kurz von der Tagung des IVSS (Internationale Vereinigung für Soziale Sicherheit) in Paris, bei der u.a. eine französische Datenbank (COLCHIC) zu Sensibilisierung vorgestellt wurde und Frau Corsini aus Mailand Bewertungen sensibilisierender Substanzen vorstellte. Er schlug vor, am 13./14. 6. 2017 in Wien ein internationales Treffen der in Paris vertretenen Experten mit Teilnehmern des Begleitkreises abzuhalten, um die Methodik der Bewertung sensibilisierender Substanzen abzustimmen.

9.4 Begleitkreisprotokoll Sitzung am 7. November 2016

Protokoll der 3. Sitzung des Begleitkreises zum FP-0384, 7. November 2016, Frankfurt

Begrüßung

Herr Rühl begrüßte die Anwesenden und eröffnete die Sitzung des Begleitkreises

Fritz Kalberlah: Sachstand, Ergebnisübersicht

Der Projektinhalt des laufenden Projekts (FP-0384) war in der ersten Sitzung des Begleitkreises (9.9.2015) vorgestellt worden. Er setzte sich danach aus folgenden Aktivitäten zusammen:

- Überprüfung der im Vorläuferprojekt gewählten Bewertungsmethodik
- Ausdehnung der Substanzauswahl
- Erweiterte Dokumentation zur sensibilisierenden Wirkung bei erweiterter Substanzauswahl
- Berücksichtigung zusätzlicher Humandaten
- Durchführung zusätzlicher *in vitro* Testungen
- Berücksichtigung von Ergebnissen einer zusätzlichen *in silico*-Analyse
- Durchführung eines aktualisierten Rankings für die Gesamtstoffliste
- Charakterisierung anderer toxikologischer Endpunkte
- Diskussion spezieller Bewertungsfragen: Mengeneinfluss, Einordnung anderer toxikologischer Endpunkte, aggregierte Bewertung, neue Epoxidharzsysteme

- Generierung einer ersten „Epoxi-Komponenten-Charakterisierungstabelle“ im Rahmen eines Epoxidharzinformationssystems (EIS).

Der Begleitkreis konnte mit der heutigen Sitzung feststellen, dass alle vorgesehenen Arbeitsschritte des Projektumfangs mit der erforderlichen Sorgfalt und fachlichen Qualifikation durchgeführt wurden. Die Vorschläge des Begleitkreises (etwa zur Substanzauswahl und zu Vertiefungsthemen) wurden berücksichtigt.

Als Projektergebnis ergibt sich danach:

- die Substanzauswahl von 52 Stoffen (Vorprojekt) wurde um 14 Stoffe erweitert,
- die Bewertungsmethodik aus dem Vorläuferprojekt hat sich auch nach Prüfung neuerer methodischer Ansätze als geeignet bestätigt,
- somit haben sich auch die *in vitro* Tests, die im Vorläuferprojekt (in kleinem Umfang) durchgeführt und zur Bewertung herangezogen wurden, in ihrer Aussagekraft bestätigt und somit konnten für das hier begleitete Folgeprojekt in angemessener Weise wieder (und umfänglicher) eingesetzt werden,
- nach den vorliegenden Auswertungen ergibt sich aus dem Ranking eine hilfreiche Differenzierung von Wirkstärken („gering oder mäßig“ (GMS), oder „hoch“ (HS)), wobei bedauerlicherweise die Datenlage auch nach Abschluss dieses Projekts unter Berücksichtigung des hier vorgegebenen Rahmens für eigene experimentelle Testungen so begrenzt ist, dass für eine relevante Anzahl von Substanzen keine quantitative Einschätzung der Wirkstärke erfolgen konnte („Kategorie U“),
- das Projekt zeigte eine Reihe von spezifischen Ergebnissen, die für eine weitergehende Differenzierung hilfreich sein können, so z.B. zu einem oligomerisierten Härter oder zu einem technisch veränderten Epoxidharz-Monomer („O’Boyle-Studie“),
- auch in diesem Projekt konnten wiederum relevante Humandaten (IVDK-Auswertung) berücksichtigt werden, die unter anderem darauf hinweisen, dass neben einer Sensibilisierung durch das Harz (insbesondere Bisphenol A Harze) auch in relevantem Umfang Sensibilisierungen durch andere Inhaltsstoffe von Epoxidharzsystemen zu bedenken sind,
- das Projekt zeigt konkrete Möglichkeiten für eine praxisnahe Gemischebewertung auf, die (nach eventuellen Modifikationen) hilfreich für eine praxisnahe aggregierte Bewertung von Epoxidharzsystemen sein können,
- das Projekt liefert mit dem avisierten Rahmen eines „Epoxidharzinformationssystems“ (EIS) ein wichtiges Instrument für die praxisnahe Umsetzung der Projektergebnisse.

Der Arbeitskreis hebt hervor, dass die erarbeiteten methodischen Grundlagen für das hier vorgenommene Ranking auch weitergehende Bedeutung für die Wirkstärkenbewertung sensibilisierender Arbeitsstoffe (außerhalb von Epoxidharzsystemen) besitzen und regt an,

dass überprüft werden sollte, für welche Stoffe/ Stoffgruppen mit Einstufung als „hautsensibilisierend“ (H317 nach CLP) diese Methodik zusätzlich eingesetzt werden könnte.

Diskussion zur Bewertungsmethodik und der Darstellung der Ergebnisse des Projektes

Die Fragen von H. Rühl, ob die integrierten Teststrategien (ITS) Epoxidharz-spezifisch seien und Sensibilisierung mit einem Schlüsseltest zu bewerten sei, wurden beide verneint, ITS seien ein generelles Kompendium der Auswertung und immer eine umfassende Bewertung aller Daten nötig.

Herr Rühl wollte ausdrücklich ins Protokoll aufgenommen haben, wie wertvoll und interessant die Ergebnisse dieses FP seien.

Diskussion zur Gestaltung des Epoxidharzinformationssystems, „EIS-Liste“

Frau Beth-Hübner äußerte sich sehr positiv zu diesem Vorhaben.

Herr Rühl regte an, diesen ganzen Themenkomplex auf der Webseite der BAuA zu integrieren, da es sich nicht nur um ein Problemthema der BG Bau handele. Diese Umsetzung, auch bei anderen Projekten der BG Bau, stelle vor allem ein verwaltungstechnisches Problem dar.

Frau Beth-Hübner regte an, die Ergebnisse dieses Projektes auch auf der Webseite der DGUV zu veröffentlichen oder zumindest zu anderen Webseiten zu verlinken.

Auf die Frage von Herrn Lang, wie speziell Formulierer weitergehende Informationen erhalten könnte, speziell im Hinblick auf Substitution, verwies Herr Kalberlah auf den folgenden Vortrag zur Gemischebewertung.

Herr Rouw regte an, bereits bestehende Verwendungsbeschränkungen (z.B. für MDA) mit als stoffspezifische Information aufzunehmen, ebenso Hinweise auf weitere kritische Endpunkte (endokrine Wirkungen, Ökotoxizität) sowie technische Aspekte z.B. zur Eignung für bestimmte Anwendungen.

Frau Beth-Hübner betonte die Wichtigkeit gut strukturierter Suchkriterien.

Diskussion zum Konzept der Gemischebewertung

Herr Kalberlah betonte, dass dies ein erster Ansatz sei, der in der Zukunft mit allen Beteiligten im Rahmen eines weiterführenden Projektes differenzierter ausgearbeitet werden müsste.

Auf Nachfragen der Industrievertreter wurde betont, dass konkretere Angaben zur Zusammensetzung eines Harzgemisches in Sicherheitsdatenblättern in jedem Fall zu geringeren Risikozahlen führen, während bei Angaben von Spannen zunächst im Default die obere Grenze der Spanne verwendet würde und deshalb höhere Risikozahlen resultierten. Ob man hiervon ggf. abweichen und ggf. andere Bewertungsparameter zum Ansatz kommen könnten, sei Gegenstand zukünftiger Diskussionen.

Herr Rühl verwies im Hinblick auf die Gemischebewertung nach TRGS 600 darauf hin, dass die Addition von Spannen dort (auf Basis von Faktoren aus den 90-er Jahren des letzten

Jahrhunderts) durchaus auf Werte bis 150 % addiert würden. Er schlug die Übernahme dieses Verfahrens vor, um einen Anreiz auf präzisere Angaben in Sicherheitsdatenblättern zu liefern.

Herr Steinhausen gab zu bedenken, dass 2 stark sensibilisierende Substanzen mit je 40 % Anteil im Gemisch beim Knickpunkt 40 % möglicherweise zu einer Risikounterschätzung führen könnten, da jede für sich das Potenzial zur Sensibilisierung hätte.

Herr Geier stellte heraus, dass die 40 %-Marke noch in der weiteren Ausgestaltung diskutabel sei, er sich z.B. auch 50 % vorstellen könnte.

Herr Kalberlah betonte die schmale Datenbasis für den 40 %-Wert, dieser sei aber in jedem Fall nicht überkonservativ.

Herr Lang äußerte sich kritisch hinsichtlich des Verstärkungsfaktors für ätzende Substanzen. So könnten durch stark sauer oder alkalisch wirkende Komponenten Sensibilisierer chemisch und damit auch in der Wirkstärke verändert werden (auch Abschwächung). Zudem sei Ätzwirkung ein akutes Phänomen, Sensibilisierung ein eher längerfristiger Prozess. Kennzeichnung der Ätzwirkung würde bereits die höchste Schutzniveau an Ausrüstung bedingen, insofern wäre auch ausreichend Schutz vor Sensibilisierung gegeben. Prinzipiell sei das Konzept aber positiv zu sehen, speziell unter Beteiligung der Anwender

Herr Rühl betonte, dass geforderte Schutzmaßnahmen offensichtlich nicht ausreichend befolgt würden, sonst würden keine Neusensibilisierungen erfolgen. Zudem sei die Schutzausrüstung bei ätzenden/sensibilisierenden Chemikalien identisch.

Herr Kalberlah befürwortete einen Ansatz zur weiteren Differenzierung, sah jedoch bei der jetzigen Datenlage keine Möglichkeit der konkreten Umsetzung.

Herr Geier stellte heraus, dass „Dangersignale“ der Zelle infolge von Reiz- oder Ätzwirkung durchaus die sensibilisierende Wirkung verstärken können.

Herr Kahl führte an, dass ein unterschiedliches Rating zu keinen Änderungen der Schutzausrüstung führt.

Herr Rühl wertete den Ansatz als Start in ein Konzept der Gemischebewertung, welches speziell im Hinblick auf Ersatzstoffe hilfreich sei. Für die Industrie böte es zudem einen „Schutz“ vor einer Ersatzstoff-TRGS und wäre auch deshalb für diese Interessengruppe von Vorteil.

Frau Köhler sprach die Zielgruppe der Restauratoren an, welche bei meist unzureichender Schutzausrüstung besser über die Gefahren auch hinsichtlich anderer toxikologischer Endpunkte neben der Sensibilisierung informiert würden.

Herr Gahlmann bewertete das vorgestellte Konzept als „überraschend einfaches System“ und einen positiven zu bewertenden Ansatz, mit dem eine Gefahrenminderung erreicht werden könnte. Er regte an, auch Carriereffekte (z.B. durch Benzylalkohol) mit in die Bewertungskonzept einzubeziehen.

Diskussion zum Vortrag zu Kreuzallergien beim Menschen

Herr Lang fragte, ob angesichts der geschilderten Kreuzreaktion möglicherweise Freizeitexposition fälschlicherweise als Ursache beruflicher Sensibilisierung gesehen werden könnte.

Herr Geier verneinte dies entscheiden, da die geschilderten Kreuzallergien von Haarfärbemitteln, MDI und MDA für Epoxidharze nicht relevant seien.

Abschlussdiskussion

Herr Kalberlah erläuterte den weiteren Zeitplan: Projektende ist 15. November 2016, danach erfolgt die Abfassung des Endberichtes (ca. Mitte Dezember). Die Teilnehmer des Begleitkreises haben innerhalb von 2 Wochen die Möglichkeit für Rückmeldungen, danach wird der Endbericht finalisiert.

Die Teilnehmer des Arbeitskreises sahen die vorgelegten Ergebnisse aus dem Projekt als hilfreiche Basis für Produktentwicklung, Gefährdungsabschätzung und resultierende Arbeitsschutzmaßnahmen zum sichereren Umgang mit Epoxidharzsystemen an, welche eine Reduktion der Sensibilisierungsfälle ermöglichen könnten.

Als Ergebnis ist insbesondere festzuhalten, dass die Erstellung der EIS-Liste und das Konzept der Gemiscebewertung vom Begleitkreis grundsätzlich positiv beurteilt wurde. Dies sollte umfassen:

- die Liste mit dem Ranking zu Epoxidharzinhaltsstoffen und ergänzenden stoffspezifischen Informationen (angelehnt an den Vorschlag einer solchen Liste durch die Projektnehmer)
- Regeln für die Gemiscebewertung (angelehnt an den Vorschlag einer solchen Liste durch die Projektnehmer)
- c) Hintergrundinformationen zur gesundheitlichen Bewertung von Epoxidharzen (nach späterem Beschluss)
- weitere praxisnahe Informationen zur Handhabung von Epoxidharzsystem mit dem Ziel der Reduzierung und Vermeidung von gesundheitlich nachteiligen Wirkungen (Schwerpunkt: Sensibilisierung).

Die differenzierte Ausgestaltung sei Gegenstand eines künftigen Projektes. Die Erstellung der EIS-Liste wurde auch als hilfreich im Hinblick auf Neuentwicklungen angesehen.

Als Grenzen des Konzepts sind festzuhalten:

- technische Bedingungen, die bestimmte Substitutionsmöglichkeiten nach nur gesundheitlichen Aspekten relevant einschränken und
- die hohe Wirkstärke beim mengenmäßig relevanten Harz, was die sensibilisierende Gesamtwirkung von Epoxidharzsystemen oft dominiert und damit Differenzierungen nur im beschränkten Umfang ermöglicht

Es wurde weiterhin empfohlen, die Aktivitäten (Internetpräsenz, Epoxidharzinformationssystem, Arbeitskreis), die aus dem DGUV-Projekt FP-0384 resultieren, mit denjenigen zusammenzuführen, die bislang im Rahmen des INQA erfolgten.

Hinsichtlich der Veröffentlichung der Ergebnisse regte Herr Schmidt die Internetpräsentation auf der Seite der DGUV an, Herr Rouw wollte dies für die BAuA prüfen. Frau Beth-Hübner regte weiterhin an, alle in der Zukunft erscheinenden Publikationen den Teilnehmern des Begleitkreises zukommen zu lassen.

Folgende Institutionen äußerten prinzipiell Interesse an der Unterstützung und Finanzierung des Projektes Erstellung der EIS-Liste und Ausgestaltung des Konzepts der Gemischebewertung: Unfallkasse der Länder, BG Rohstoffe und Chemische Industrie, BG der Bauwirtschaft, Verwaltungs-Berufsgenossenschaft, BG Holz und Metall, Dt. Bauchemie, Verband der Klebstoffhersteller, Plastics Europe, AUVA.

Herr Kalberlah fände die Beteiligung der BAuA wichtig und wünschenswert, Herr Rouw wollte dies überdenken und ergänzte, dass die Beteiligung der Anwender deren Position stärken würde.

Herr Kersting schlug eine konstituierende Sitzung Februar/März 2016 vor.

Alle Beteiligten des Begleitkreises würdigten nochmals ausdrücklich den reibungslosen Ablauf und die wertvollen Ergebnisse des FP-0384 und dankten allen Beteiligten für die engagierte und konstruktive Zusammenarbeit. Ausdrücklich gedankt wurde auch den Moderatoren und den finanziellen Unterstützern seitens der Behörden und der Industrie.

9.5 Mitglieder des Begleitkreises zum Projekt DGUV FP 0384

Name	Institution
Adam, Dr. Monika	BG Metall Nord Süd
Antes, Astrid	AUVA – Allgemeine Unfallversicherungsanstalt
Beth-Hübner, Dr. Maren	Berufsgenossenschaft Rohstoffe und chemische Industrie
Buchmann, Pascale	Bayer HealthCare
Emminger, Ines	Huntsman Advanced Materials (Austria) GmbH
Frei, Willy	SUVA
Gahlmann, Dr. Frank	Stauf Klebstoffwerk GmbH
Geier, Dr. Johannes	Informationsverbund Dermatologischer Kliniken
Geyer, Brigitte	Verwaltungs-Berufsgenossenschaft
Glöckner, Martin	Deutsche Bauchemie e.V.
Hassauer, Dr. Martin	Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Heine, Dr. Karin	Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Kalberlah, Dr. Fritz	Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Karl, Dr. Wolfgang	MC Bauchemie

Name	Institution
Kersting, Dr. Klaus	Berufsgenossenschaft der Bauwirtschaft
Klippstein, Achim	CTP GmbH
Kolle, Susanne	BASF SE
Köhler, Uta	Unfallkasse Nordrhein-Westfalen
Labs, Dr. Stefanie	Berufsgenossenschaft Energie Textil Elektro Medienerzeugnisse
Lang, Gunnar	Evonik Resource Efficiency GmbH
Lechtenberg-Auffarth, Dr. Eva	Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA)
Lindner, Dr. Sabine	Plastics Europe
Meyer, Walter	Hauptverband der deutsche Holz- und Möbelindustrie
Müller, Gerhard	HEXION
Nies, Dr. Eberhard	Institut für Arbeitsschutz der DGUV
Piringer, Robert	Allgemeine Unfallversicherungsanstalt
Rouw, Aart	Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA)
Rühl, Dr. Reinhold	Berufsgenossenschaft der Bauwirtschaft
Schmidt, Michael	Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV)
Steinhausen, Dr. Marco	Institut für Arbeitsschutz der DGUV
Van Geutselaar, Ans	ARBOUW
Vogel, Dr. Michael	Evonik Resource Efficiency GmbH
Ziegler, Corinne	Berufsgenossenschaft der Bauwirtschaft

10 LITERATUR

- Adenuga, D.; Woolhiser, M.R.; Gollapudi, B.B.; Boverhof, D.R. (2012)
Differential gene expression responses distinguish contact and respiratory sensitizers and nonsensitizing irritants in the local lymph node assay
Toxicological Sciences, 126, 413-425
- Ahmed, S.S.; Wang, X.N.; Fielding, M.; Kerry, A.; Dickinson, I.; Munuswamy, R.; Kimber, I.; Dickinson, A.M. (2016)
An in vitro human skin test for assessing sensitization potential
Journal of Applied Toxicology, 36, 669-684
- Albrekt, A.S.; Johansson, H.; Börje, A.; Borrebaeck, C.; Lindstedt, M. (2014)
Skin sensitizers differentially regulate signaling pathways in MUTZ-3 cells in relation to their individual potency
BMC Pharmacol Toxicol, 15:5, 1-12
- Alves, V.M.; Muratov, E.N.; Fourches, D.; Strickland, J.; Kleinstreuer, N.; Andrade, C.H.; Tropsha, A. (2015)
Predicting chemically-induced skin reactions. Part II: QSAR models of skin permeability and the relationships between skin permeability and skin sensitization
Toxicology and Applied Pharmacology, 284, 273-280
- Api, A.M.; Basketter, D.; Lalko, J. (2015)
Correlation between experimental human and murine skin sensitization induction thresholds
Cutaneous and Ocular Toxicology, 34, 298-302
- 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)
ATLA, Alternatives to Laboratory Animals, 38, 275-284
- Asturiol, D.; Casati, S.; Worth, A. (2016)
Consensus of classification trees for skin sensitisation hazard prediction
Toxicology In Vitro, 36, 197-209
- Basketter, D.; Alépée, N.; Casati, S.; Crozier, J.; Eigler, D.; Griem, P.; Hubesch, B.; de Knecht, J.; Landsiedel, R.; Louekari, K.; Manou, I.; Maxwell, G.; Mehling, A.; Netzeva, T.; Petry, T.; Rossi, L.H. (2013)
Skin sensitisation – Moving forward with non-animal testing strategies for regulatory purposes in the EU
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 67, 531-535
- Basketter, D.; Ashikaga, T.; Casati, S.; Hubesch, B.; Jaworska, J.; de Knecht, J.; Landsiedel, R.; Manou, I.; Mehling, A.; Petersohn, D.; Rorije, E.; Rossi, L.H.; Steiling, W.; Teissier, S.; Worth, A. (2015)
Alternatives for skin sensitisation: Hazard identification and potency categorisation: Report from an EPAA/CEFIC LRI/Cosmetics Europe cross sector workshop, ECHA Helsinki, April 23rd and 24th 2015
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 73, 660-666

- Basketter, D.; Casati, S. (2014)
Dermal Toxicity: Skin Sensitization. Chapter 10
In: Bal-Price, A.; Jennings, P., *In Vitro Toxicology Systems*. Series: Methods in Pharmacology and Toxicology Humana Press, 225-239
- Basketter, D.; Kolle, S.N.; Schrage, A.; Honarvar, N.; Gamer, A.O.; van Ravenzwaay, B.; Landsiedel, R. (2012)
Experience with local lymph node assay performance standards using standard radioactivity and nonradioactive cell count measurements
Journal of Applied Toxicology, 32, 590-596
- Basketter, D.A.; Alépée, N.; Ashikaga, T.; Barroso, J.; Gilmour, N.; Goebel, C.; Hibatallah, J.; Hoffmann, S.; Kern, P.; Martinozzi-Teissier, S.; Maxwell, G.; Reisinger, K.; Sakaguchi, H.; Schepky, A.; Tailhardat, M.; Templier, M. (2014)
Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency
Dermatitis, 25, 11-21
- Basketter, D.A.; Kimber, I. (2006)
Predictive tests for irritants and allergens and their use in quantitative risk assessment
In: Frosch, P.J.; Menné, T.; Lepoittevin, P.-J., *Contact Dermatitis*, Springer, Berlin Heidelberg New York, 179-187, zitiert nach Nukada et al., 2011
- Basketter, D.A.; McFadden, J.; Evans, P.; Andersen, K.E.; Jowsey, I. (2006)
Identification and classification of skin sensitizers: identifying false positives and false negatives
Contact Dermatitis, 55, 268-273
- Bauch, C.; Kolle, S.N.; Ramirez, T.; Eltze, 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
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 63, 489-504
- Benfenati, E.; Manganaro, A.; Gini, G.C. (2013)
VEGA-QSAR: AI Inside a Platform for Predictive Toxicology
CEUR Workshop Proceedings - PAI 2013, 21-28
- Casati, S.; Aschberger, K.; Asturiol, D.; Basketter, D.; Dimitrov, S.; Dumont, C.; Karlberg, A.T.; Lepoittevin, J.P.; Patlewicz, G.; Roberts, D.W.; Worth, A. (2016)
Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and Recommendations of an EURL ECVAM Expert Meeting. JRC Technical Reports. EUR 27752 EN
European Commission, Joint Research Centre, European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing, Italy
- chemBlink (2016)
Online Database of Chemicals from Around the World
<http://www.chemblink.com/index.htm>
- ChemicalBook Inc. (2016)
ChemicalBook (Database)
http://www.chemicalbook.com/ProductIndex_EN.aspx
- Corsini, E.; Galbiati, V.; Mitjans, M.; Galli, C.L.; Marinovich, M. (2013)

NCTC 2544 and IL-18 production: a tool for the identification of contact allergens

Toxicology In Vitro, 27, 1127-1134

Corsini, E.; Mitjans, M.; Galbiati, V.; Lucchi, L.; Galli, C.L.; Marinovich, M. (2009)

Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens

Toxicology In Vitro, 23, 789-796

Cottrez, F.; Boitel, E.; Auriault, C.; Aeby, P.; Groux, H. (2015)

Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay

Toxicology In Vitro, 29, 787-802

Cottrez, F.; Boitel, E.; Ourlin, J.-C.; Peiffer, J.-L.; Fabre, I.; Henaoui, I.-S.; Mari, B.; Vallauri, A.; Paquet, A.; Barbry, P.; Auriault, C.; Aeby, P.; Groux, H. (2016)

SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study

Toxicology In Vitro, 32, 248-260

Dancik, Y.; Miller, M.A.; Jaworska, J.; Kasting, G.B. (2013)

Design and performance of a spreadsheet-based model for estimating bioavailability of chemicals from dermal exposure

Advanced Drug Delivery Reviews, 65, 221-236

Debeuckelaere, C.; Berl, V.; Elbayed, K.; Moussallieh, F.M.; Namer, I.J.; Lepoittevin, J.P. (2015)

Matrix effect of human reconstructed epidermis on the chemoselectivity of a skin sensitizing α -methylene- γ -butyrolactone: consequences for the development of in *chemico* alternative methods

Chemical Research in Toxicology, 28, 2192-2198

Debeuckelaere, C.; Moussallieh, F.-M.; Elbayed, K.; Namer, I.-J.; Berl, V.; Giménez-Arnau, E.; Lepoittevin, J.-P. (2016)

In situ chemical behaviour of methylisothiazolinone (MI) and methylchloroisothiazolinone (MCI) in reconstructed human epidermis: a new approach to the cross-reactivity issue

Contact Dermatitis, 74, 159-167

Delaine, T.; Hagvall, L.; Rudbäck, J.; Luthman, K.; Karlberg, A.T. (2013)

Skin sensitization of epoxyaldehydes: importance of conjugation

Chemical Research in Toxicology, 26, 674-684

Delaine, T.; Niklasson, I.B.; Emter, R.; Luthman, K.; Karlberg, A.T.; Natsch, A. (2011)

Structure-activity relationship between the in vivo skin sensitizing potency of analogues of phenyl glycidyl ether and the induction of Nrf2-dependent luciferase activity in the KeratinoSens in vitro assay

Chemical Research in Toxicology, 24, 1312-1318

Delaine, T.; Ponting, D.J.; Niklasson, I.B.; Emter, R.; Hagvall, L.; Norrby, P.-O.; Natsch, A.; Luthman, K.; Karlberg, A.-T. (2014)

Epoxyalcohols: bioactivation and conjugation required for skin sensitization

Chemical Research in Toxicology, 27, 1860-1870

Dimitrov, S.; Detroyer, A.; Piroird, C.; Gomes, C.; Eilstein, J.; Pauloin, T.; Kuseva, C.; Ivanova, H.; Popova, I.; Karakolev, Y.; Ringeissen, S.; Mekenyan, O. (2016)

Accounting for data variability, a key factor in *in vivo/in vitro* relationships: application to the skin sensitization potency (*in vivo* LLNA versus *in vitro* DPRA) example
Journal of Applied Toxicology, 36, 1568-1578

Dimitrov, S.D.; Low, L.K.; Patlewicz, G.Y.; Kern, P.S.; Dimitrova, G.D.; Comber, M.H.I.; Phillips, R.D.; Niemela, J.; Bailey, P.T.; Mekenyan, O.G. (2005)
Skin sensitization: modeling based on skin metabolism simulation and formation of protein conjugates
International Journal of Toxicology, 24, 189-205

dos Santos, G.G.; Spiekstra, S.W.; Sampat-Sardjoepersad, S.C.; Reinders, J.; Scheper, R.J.; Gibbs, S. (2011)
A potential *in vitro* epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency
Toxicology In Vitro, 25, 347-357

Dumont, C.; Barroso, J.; Matys, I.; Worth, A.; Casati, S. (2016)
Analysis of the local lymph node assay (LLNA) variability for assessing the prediction of skin sensitisation potential and potency of chemicals with non-animal approaches
Toxicology In Vitro, 34, 220-228

EC, European Commission (2008)
Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006
Official Journal of the European Union, L 353, 1-1355

EC, European Commission (2013)
EURL ECVAM RECOMMENDATION on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for Skin Sensitisation Testing
European Commission; Joint Research Centre; Institute for Health and Consumer Protection; EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM). <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>

EC, European Commission (2014)
EURL ECVAM RECOMMENDATION on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing
European Commission, Joint Research Centre; Institute for Health and Consumer Protection; EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM), Ispra, Italy. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation>

EC, European Commission (2015)
EURL ECVAM RECOMMENDATION on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitisation testing
European Commission, Joint Research Centre; Institute for Health and Consumer Protection; EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM), Ispra, Italy. <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>

EC, European Commission (2016)

COMMISSION REGULATION (EU) 2016/1688 of 20 September 2016 amending Annex VII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards skin sensitisation
Official Journal of the European Union, L 255/14, 3p. <http://eur-lex.europa.eu>

ECETOC, European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (2003)
Technical Report No. 87. Contact Sensitisation Classification According to Potency
Brussels, Belgium

ECHA, European Chemicals Agency (2016a)
Information on Chemicals - Classification & Labelling Inventory
Online: <http://echa.europa.eu/information-on-chemicals/cl-inventory>, Disclaimer:
<http://echa.europa.eu/web/guest/legal-notice>

ECHA, European Chemicals Agency (2016b)
Information on Chemicals - Registered Substances
Online: <http://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/registered-substances>

Ehling, G.; Hecht, M.; Heusener, A.; Huesler, J.; Gamer, A.O.; van Loveren, H.; Maurer, T.; Riecke, K.; Ullmann, L.; Ulrich, P.; Vandebriel, R.; Vohr, H.-W. (2005)
An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: Second round
Toxicology, 212, 69-79

Emter, R.; Ellis, G.; Natsch, A. (2010)
Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro
Toxicology and Applied Pharmacology, 245, 281-290

Enoch, S.J.; Roberts, D.W. (2013)
Predicting skin sensitization potency for michael acceptors in the LLNA using quantum mechanics calculations
Chemical Research in Toxicology, 26, 767-774

EU, Europäische Union (2011)
Verordnung (EU) Nr. 286/2011 der Kommission vom 10. März 2011 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen zwecks Anpassung an den technischen und wissenschaftlichen Fortschritt
Amtsblatt der Europäischen Union. L 83, 54, 1-57

Ezendam, J.; Braakhuis, H.M.; Vandebriel, R.J. (2016)
State of the art in non-animal approaches for skin sensitization testing: from individual test methods towards testing strategies
Archives of Toxicology, 90, 2861-2883

Ezendam, J.; Muller, A.; Hakkert, B.C.; van Loveren, H. (2013)
Evaluation of the performance of the reduced local lymph node assay for skin sensitization testing
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 66, 66-71

Fitzpatrick, J.M.; Roberts, D.W.; Patlewicz, G. (2017a)
Is skin penetration a determining factor in skin sensitization potential and potency? Refuting the notion of a LogKow threshold for skin sensitization

Journal of Applied Toxicology, 37, 117-127

Fitzpatrick, J.M.; Roberts, D.W.; Patlewicz, G. (2017b)

What determines skin sensitization potency: Myths, maybes and realities. The 500 molecular weight cut-off: An updated analysis

Journal of Applied Toxicology, 37, 105-116

Frohwein, T.A.; Sonnenburg, A.; Zuberbier, T.; Stahlmann, R.; Schreiner, M. (2016)

Unsaturated compounds induce up-regulation of CD86 on dendritic cells in the in vitro sensitization assay LCSA

Archives of Toxicology, 90, 927-936

Frombach, J.; Sonnenburg, A.; Krapohl, B.-D.; Zuberbier, T.; Stahlmann, R.; Schreiner, M. (2016a)

Erratum to: A novel method to generate monocyte-derived dendritic cells during coculture with HaCaT facilitates detection of weak contact allergens in cosmetics

Archives of Toxicology, in press, 1

Frombach, J.; Sonnenburg, A.; Krapohl, B.-D.; Zuberbier, T.; Stahlmann, R.; Schreiner, M. (2016b)

A novel method to generate monocyte-derived dendritic cells during coculture with HaCaT facilitates detection of weak contact allergens in cosmetics

Archives of Toxicology, in press, 1-12

Fujita, M.; Yamamoto, Y.; Tahara, H.; Kasahara, T.; Jimbo, Y.; Hioki, T. (2014)

Development of a prediction method for skin sensitization using novel cysteine and lysine derivatives

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 70, 94-105

Gamer, A.O.; Nies, E.; Vohr, H.-W. (2008)

Local lymph node assay (LLNA): comparison of different protocols by testing skin-sensitizing epoxy resin system components

Regulatory Toxicology and Pharmacology, 52, 290-298

Gerberick, F.; Aleksic, M.; Basketter, D.; Casati, S.; Karlberg, A.T.; Kern, P.; Kimber, I.; Lepoittevin, J.P.; Natsch, A.; Ovigne, J.M.; Rovida, C.; Sakaguchi, H.; Schultz, T. (2008)

Chemical reactivity measurement and the predictive identification of skin sensitizers

ATLA, Alternatives to Laboratory Animals, 36, 215-242

Gerberick, G.F.; Troutman, J.A.; Foertsch, L.M.; Vassallo, J.D.; Quijano, M.; Dobson, R.L.; Goebel, C.; Lepoittevin, J.P. (2009)

Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system

Toxicological Sciences, 112, 164-174

Gibbs, S.; Corsini, E.; Spiekstra, S.W.; Galbiati, V.; Fuchs, H.W.; DeGeorge, G.; Troese, M.; Hayden, P.; Deng, W.; Roggen, E. (2013)

An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers

Toxicology and Applied Pharmacology, 272, 529-541

Goebel, C.; Troutman, J.; Hennen, J.; Rothe, H.; Schlatter, H.; Gerberick, G.F.; Blömeke, B. (2014)

Introduction of a methoxymethyl side chain into *p*-phenylenediamine attenuates its sensitizing potency and reduces the risk of allergy induction

Toxicology and Applied Pharmacology, 274, 480-487

- Gomes, C.; Nocairi, H.; Thomas, M.; Ibanez, F.; Collin, J.-F.; Saporta, G. (2013)
Stacking prediction for a binary outcome
In: Colubi, A., 20th International Conference on Computational Statistics (COMPSTAT 2012).
Proceedings of a meeting held 27-31 August 2012, Limassol, Cyprus, 271-282
- Guyard-Nicodème, M.; Gerault, E.; Platteel, M.; Peschard, O.; Veron, W.; Mondon, P.; Pascal, S.;
Feuilloley, M.G.J. (2015)
Development of a multiparametric *in vitro* model of skin sensitization
Journal of Applied Toxicology, 35, 48-58
- HCN, Health Council of the Netherlands (2010)
Health-Based Recommended Occupational Exposure Limit for Cyclic Acid Anhydrides. Publ. No.
2010/02OSH
The Hague, Netherlands
- HCN, Health Council of the Netherlands (2015)
Health-Based Calculated Occupational Cancer Risk Values. 4,4-Methylenedianiline. No. 2015/28
Dutch Expert Committee on Occupational Safety, Health Council of the Netherlands, The Hague.
http://www.gezondheidsraad.nl/sites/default/files/201528_44-methylenedianiline.pdf
- Heine, K.; Kalberlah, F.; Hassauer, M.; Geier, J.; Lessmann, H. (2012)
Ranking von Stoffen in Epoxidharzsystemen aufgrund ihrer sensibilisierenden Wirkstärken (FP-0324)
erstellt im Auftrag der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV), Sankt Augustin;
<http://www.bgbau.de/gisbau/fachthemen/epoxi/downloads/Gesamtbericht.pdf>
- 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
Journal of Applied Toxicology, 35, 1333-1347
- Hirota, M.; Kouzuki, H.; Ashikaga, T.; Sono, S.; Tsujita, K.; Sasa, H.; Aiba, S. (2013)
Artificial neural network analysis of data from multiple *in vitro* assays for prediction of skin
sensitization potency of chemicals
Toxicology In Vitro, 27, 1233-1246
- Hoffmann, S. (2015)
LLNA variability: An essential ingredient for a comprehensive assessment of non-animal skin
sensitization test methods and strategies
ALTEX - Alternativen zu Tierexperimenten, 32, 379-383
- Hooyberghs, J.; Schoeters, E.; Lambrechts, N.; Nelissen, I.; Witters, H.; Schoeters, G.; Van Den Heuvel,
R. (2008)
A cell-based *in vitro* alternative to identify skin sensitizers by gene expression
Toxicology and Applied Pharmacology, 231, 103-111
- Jaworska, J.; Dancik, Y.; Kern, P.; Gerberick, F.; Natsch, A. (2013)
Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice
Journal of Applied Toxicology, 33, 1353-1364
- Jaworska, J.; Harol, A.; Kern, P.S.; Gerberick, G.F. (2011)

Integrating non-animal test information into an adaptive testing strategy - skin sensitization proof of concept case

ALTEX - Alternativen zu Tierexperimenten, 28, 211-225

Jaworska, J.S.; 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

Archives of Toxicology, 89, 2355-2383

Johansson, H.; Albrekt, A.-S.; Borrebaeck, C.A.K.; Lindstedt, M. (2013)

The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers

Toxicology In Vitro, 27, 1163-1169

Johansson, H.; Lindstedt, M.; Albrekt, A.S.; Borrebaeck, C.A. (2011)

A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests

BMC Genomics, 12:399, 1-19

Jung, E.C.; Maibach, H.I. (2015)

Animal models for percutaneous absorption

Journal of Applied Toxicology, 35, 1-10

Kimber, I.; Basketter, D.A.; Butler, M.; Gamer, A.; Garrigue, J.L.; Gerberick, G.F.; Newsome, C.; Steiling, W.; Vohr, H.-W. (2003)

Classification of contact allergens according to potency: proposals

Food and Chemical Toxicology, 41, 1799-1809

Kolle, S.N.; Basketter, D.; Schrage, A.; Gamer, A.O.; van Ravenzwaay, B.; Landsiedel, R. (2012)

Further experience with the local lymph node assay using standard radioactive and nonradioactive cell count measurements

Journal of Applied Toxicology, 32, 597-607

Kolle, S.N.; Basketter, D.A.; Casati, S.; Stokes, W.S.; Strickland, J.; van Ravenzwaay, B.; Vohr, H.W.; Landsiedel, R. (2013)

Performance standards and alternative assays: practical insights from skin sensitization

Regulatory Toxicology and Pharmacology, 65, 278-285

Lalko, J.F.; Dearman, R.J.; Gerberick, G.F.; Troutman, J.A.; Api, A.M.; Kimber, I. (2013)

Reactivity of chemical respiratory allergens in the Peroxidase Peptide Reactivity Assay

Toxicology In Vitro, 27, 651-661

Lambrechts, N.; Vanheel, H.; Nelissen, I.; Witters, H.; van den Heuvel, R.; van Tendeloo, V.; Schoeters, G.; Hooyberghs, J. (2010)

Assessment of chemical skin-sensitizing potency by an in vitro assay based on human dendritic cells

Toxicological Sciences, 116, 122-129

Leung, H.-W.; Auletta, C.S. (1997)

Evaluation of skin sensitization and cross-reaction of nine alkyleneamines in the guinea pig maximization test

Journal of Toxicology / Cutaneous and Ocular Toxicology, 16, 189-195

Luechtefeld, T.; Maertens, A.; McKim, J.M.; Hartung, T.; Kleensang, A.; Sá-Rocha, V. (2015)

Probabilistic hazard assessment for skin sensitization potency by dose-response modeling using feature elimination instead of quantitative structure-activity relationships
Journal of Applied Toxicology, 35, 1361-1371

Luechtefeld, T.; Maertens, A.; Russo, D.P.; Rovida, C.; Zhu, H.; Hartung, T. (2016)
Analysis of publically available skin sensitization data from REACH registrations 2008-2014
ALTEX - Alternativen zu Tierexperimenten, 33, 135-148

MacKey, C.; Davies, M.; Summerfield, V.; Maxwell, G. (2013)
From pathways to people: applying the adverse outcome pathway (AOP) for skin sensitization to risk assessment
ALTEX - Alternativen zu Tierexperimenten, 30, 473-486

Martin, S.F.; Esser, P.R.; Schmucker, S.; Dietz, L.; Naisbitt, D.J.; Park, B.K.; Vocanson, M.; Nicolas, J.-F.; Keller, M.; Pichler, W.J.; Peiser, M.; Luch, A.; Wanner, R.; Maggi, E.; Cavani, A.; Rustemeyer, T.; Richter, A.; Thierse, H.-J.; Sallusto, F. (2010)
T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of in vitro assays
Cellular and Molecular Life Sciences, 67, 4171-4184

Matsumoto, M.; Kobayashi, K.; Takahashi, M.; Hirata-Koizumi, M.; Ono, A.; Hirose, A. (2015)
Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (I)
Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku, 133, 42-47

Maxwell, G.; Aleksic, M.; Davies, M.; Fentem, J.; Hughes, M.; MacKay, C.; Moore, C.; Summerfield, V.; Reynolds, F.; Westmoreland, C.; Zazzeroni, R. (2012)
Skin sensitization: modeling the human adverse response
ALTEX Proceedings, 1/12, 225-229

Maxwell, G.; MacKay, C.; Cubberley, R.; Davies, M.; Gellatly, N.; Glavin, S.; Gouin, T.; Jacquilleot, S.; Moore, C.; Pendlington, R.; Saib, O.; Sheffield, D.; Stark, R.; Summerfield, V. (2014)
Applying the skin sensitisation adverse outcome pathway (AOP) to quantitative risk assessment
Toxicology In Vitro, 28, 8-12

McKim, J.M.; Keller, D.J.; Gorski, J.R. (2010)
A new in vitro method for identifying chemical sensitizers combining peptide binding with ARE/EpRE-mediated gene expression in human skin cells
Cutaneous and Ocular Toxicology, 29, 171-192

McKim, J.M.; Keller, D.J.; Gorski, J.R. (2012)
An *in vitro* method for detecting chemical sensitization using human reconstructed skin models and its applicability to cosmetic, pharmaceutical, and medical device safety testing
Cutaneous and Ocular Toxicology, 31, 292-305

Mehling, A.; Eriksson, T.; Eltze, T.; Kolle, S.; Ramirez, T.; Teubner, W.; van Ravenzwaay, B.; Landsiedel, R. (2012)
Non-animal test methods for predicting skin sensitization potentials
Archives of Toxicology, 86, 1273-1295

Morimoto, T.; Higaki, T.; Ota, M.; Inawaka, K.; Kawamura, S.; Bungo, T. (2014)
Effect of simultaneous exposure to mixture of two skin sensitizers on skin sensitization response in guinea pigs and mice

Journal of Toxicological Sciences, 39, 163-171

Nandy, A.; Kar, S.; Roy, K. (2013)

Development and validation of regression-based QSAR models for quantification of contributions of molecular fragments to skin sensitization potency of diverse organic chemicals

SAR and QSAR in Environmental Research, 24, 1009-1023

Natsch, A.; Emter, R. (2008)

Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the *in vitro* testing of the sensitization potential of chemicals

Toxicological Sciences, 102, 110-119

Natsch, A.; Emter, R. (2015)

Reporter cell lines for skin sensitization testing

Archives of Toxicology, 89, 1645-1668

Natsch, A.; Emter, R.; Gfeller, H.; Haupt, T.; Ellis, G. (2015)

Predicting skin sensitizer potency based on *in vitro* data from KeratinoSens and kinetic peptide binding: Global vs. domain-based assessment

Toxicological Sciences, 143, 319-332

Natsch, A.; Ryan, C.A.; Foertsch, L.; Emter, R.; Jaworska, J.; Gerberick, F.; Kern, P. (2013)

A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation

Journal of Applied Toxicology, 33, 1337-1352

Niklasson, I.B.; Broo, K.; Jonsson, C.; Luthman, K.; Karlberg, A.-T. (2009)

Reduced sensitizing capacity of epoxy resin systems: a structure-activity relationship study

Chemical Research in Toxicology, 22, 1787-1794

Niklasson, I.B.; Delaine, T.; Luthman, K.; Karlberg, A.T. (2011)

Impact of a heteroatom in a structure-activity relationship study on analogues of phenyl glycidyl ether (PGE) from epoxy resin systems

Chemical Research in Toxicology, 24, 542-548

NLM, U.S. National Library of Medicine (2016a)

ChemIDplus Lite

online: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>

NLM, U.S. National Library of Medicine (2016b)

PubChem

online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

NLM, U.S. National Library of Medicine (2016c)

PubMed

online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>

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

Toxicology In Vitro, 26, 1150-1160

- Nukada, Y.; Miyazawa, M.; Kazutoshi, S.; Sakaguchi, H.; Nishiyama, N. (2013)
Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals
Toxicology In Vitro, 27, 609-618
- O'Boyle, N.; Niklasson, I.B.; Tehrani-Bagha, A.R.; Delaine, T.; Holmberg, K.; Luthman, K.; Karlberg, A.-T. (2014)
Epoxy resin monomers with reduced skin sensitizing potency
Chemical Research in Toxicology, 27, 1002-1010
- O'Boyle, N.M.; Delaine, T.; Luthman, K.; Natsch, A.; Karlberg, A.-T. (2012)
Analogues of the epoxy resin monomer diglycidyl ether of bisphenol F: effects on contact allergenic potency and cytotoxicity
Chemical Research in Toxicology, 25, 2469-2478
- OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2003)
SIDS Initial Assessment Report for SIAM 17 (Arona, Italy, 11-14 November 2003). 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES)
Paris, France. <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/919302.pdf>
- OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2010a)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals. In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. No. 439, Adopted: 22 July 2010
<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-TG439.pdf>
- OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2010b)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay. No. 429, Adopted: 22 July 2010
- OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2012a)
The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No.168. ENV/JM/MONO(2012)10/PART1
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en)
- OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2012b)
The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 2: Use of the AOP to Develop Chemical Categories and Integrated Assessment and Testing Approaches. Series on Testing and Assessment No. 168. ENV/JM/MONO(2012)10/PART2
<http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282012%2910/part2&doclanguage=en>
- OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2015a)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *In Chemico* Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). TG 442C. Adopted: 4 February 2015
http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals_chem_guide_pkg-en
- OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2015b)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *In Vitro* Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. TG 442D. Adopted: February 2015

http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals_chem_guide_pkg-en

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2016a)
 OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4, Health Effects. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation. Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)
http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264264359-en

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2016b)
 QSAR Application Toolbox – Software for grouping chemicals into categories and filling gaps in (eco)toxicity data needed for assessing the hazards of chemicals (Version 3.4)
<http://www.qsartoolbox.org/>

Patlewicz, G.; Casati, S.; Basketter, D.A.; Asturiol, D.; Roberts, D.W.; Lepoittevin, J.P.; Worth, A.P.; Aschberger, K. (2016)
 Can currently available non-animal methods detect pre and pro-haptens relevant for skin sensitization?
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 82, 147-155

Patlewicz, G.; Kuseva, C.; Kesova, A.; Popova, I.; Zhechev, T.; Pavlov, T.; Roberts, D.W.; Mekenyan, O. (2014)
 Towards AOP application – Implementation of an integrated approach to testing and assessment (IATA) into a pipeline tool for skin sensitization
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 69, 529-545

Piroird, C.; Ovigne, J.M.; Rousset, F.; Martinozzi-Teissier, S.; Gomes, C.; Cotovio, J.; Alepee, 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
Toxicology In Vitro, 29, 901-916

Pirone, J.R.; Smith, M.; Kleinstreuer, N.C.; Burns, T.A.; Strickland, J.; Dancik, Y.; Morris, R.; Rinckel, L.A.; Casey, W.; Jaworska, J.S. (2014)
 Open source software implementation of an integrated testing strategy for skin sensitization potency based on a Bayesian network
ALTEX - Alternativen zu Tierexperimenten, 31, 336-340

Ramirez, T.; Mehling, A.; Kolle, S.N.; Wruck, C.J.; Teubner, W.; Eltze, T.; Aumann, A.; Urbisch, D.; van Ravenzwaay, B.; Landsiedel, R. (2014)
 LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification
Toxicology In Vitro, 28, 1482-1497

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. (2015)
 Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment
Toxicology In Vitro, 29, 259-270

Richter, A.; Schmucker, S.S.; Esser, P.R.; Traska, V.; Weber, V.; Dietz, L.; Thierse, H.J.; Pennino, D.; Cavani, A.; Martin, S.F. (2013)

Human T cell priming assay (hTCPA) for the identification of contact allergens based on naive T cells and DC--IFN- γ and TNF- α readout
Toxicology In Vitro, 27, 1180-1185

Roberts, D.W. (2015)
Estimating skin sensitization potency from a single dose LLNA
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 71, 437-443

Roberts, D.W.; Api, A.M.; Aptula, A.O. (2016a)
Chemical applicability domain of the Local Lymph Node Assay (LLNA) for skin sensitisation potency. Part 2. The biological variability of the murine Local Lymph Node Assay (LLNA) for skin sensitisation
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 80, 255-259

Roberts, D.W.; Api, A.M.; Patlewicz, G.; Schultz, T.W. (2016b)
Chemical applicability domain of the Local Lymph Node Assay (LLNA) for skin sensitization potency. Part 1. Underlying physical organic chemistry principles and the extent to which they are represented in the LLNA validation dataset
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 80, 247-254

Roberts, D.W.; Mekenyan, O.G.; Dimitrov, S.D.; Dimitrova, G.D. (2012)
What determines skin sensitization potency-myths, maybes and realities. Part 1. The 500 molecular weight cut-off
Contact Dermatitis, 68, 32-41

Roberts, D.W.; Schultz, T.W.; Api, A.M. (2016c)
Chemical applicability domain of the Local Lymph Node Assay (LLNA) for skin sensitisation potency. Part 3. Apparent discrepancies between LLNA and GPMT sensitisation potential: False positives or differences in sensitivity?
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 80, 260-267

Rorije, E.; Aldenberg, T.; Buist, H.; Kroese, D.; Schuurmann, G. (2013)
The OSIRIS Weight of Evidence approach: ITS for skin sensitisation
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 67, 146-156

Rovida, C.; Alepee, N.; Api, A.M.; Basketter, D.A.; Bois, F.Y.; Caloni, F.; Corsini, E.; Daneshian, M.; Eskes, C.; Ezendam, J.; Fuchs, H.; Hayden, P.; Hegele-Hartung, C.; Hoffmann, S.; Hubesch, B.; Jacobs, M.N.; Jaworska, J.; Kleinsang, A.; Kleinstreuer, N.; Lalko, J.; Landsiedel, R.; Lebreux, F.; Luechtefeld, T.; Locatelli, M.; Mehling, A.; Natsch, A.; Pitchford, J.W.; Prater, D.; Prieto, P.; Schepky, A.; Schuurmann, G.; Smirnova, L.; Toole, C.; van Vliet, E.; Weisensee, D.; Hartung, T. (2015)
Integrated Testing Strategies (ITS) for safety assessment
ALTEX - Alternativen zu Tierexperimenten, 32, 25-40

Royal Society of Chemistry (2016)
ChemSpider
<http://www.chemspider.com/search.aspx>

Russell, W.M.S.; Burch, R.L. (1959)
The Principles of Humane Experimental Technique. PART ONE: THE SCOPE OF HUMANE TECHNIQUE
http://altweb.ihsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc

Saito, K.; Miyazawa, M.; Nukada, Y.; Sakaguchi, H.; Nishiyama, N. (2013a)
Development of an *in vitro* skin sensitization test based on ROS production in THP-1 cells

Toxicology In Vitro, 27, 857-863

Saito, K.; Nukada, Y.; Takenouchi, O.; Miyazawa, M.; Sakaguchi, H.; Nishiyama, N. (2013b)
Development of a new *in vitro* skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA)
using reconstructed human epidermis
Toxicology In Vitro, 27, 2213-2224

Sonnenburg, A.; Ahuja, V.; Schreiner, M.; Platzek, T.; Stahlmann, R. (2012)
Assessment of the sensitizing potential of textile disperse dyes and some of their metabolites by the
loose-fit coculture-based sensitization assay (LCSA)
Archives of Toxicology, 86, 733-740

Sonnenburg, A.; Schreiner, M.; Stahlmann, R. (2015)
Assessment of the sensitizing potency of preservatives with chance of skin contact by the loose-fit
coculture-based sensitization assay (LCSA)
Archives of Toxicology, 89, 2339-2344

Strauss, V.; Kolle, S.N.; Honarvar, N.; Dammann, M.; Groeters, S.; Faulhammer, F.; Landsiedel, R.; van
Ravenzwaay, B. (2015)
Immunophenotyping does not improve predictivity of the local lymph node assay in mice
Journal of Applied Toxicology, 35, 434-445

Strickland, J.; Zang, Q.; Kleinstreuer, N.; Paris, M.; Lehmann, D.M.; Choksi, N.Y.; Matheson, J.; Jacobs,
A.; Lowit, A.; Allen, D.; Casey, W. (2016a)
Integrated decision strategies for skin sensitization hazard
Journal of Applied Toxicology, 36, 1150-1162

Strickland, J.; Zang, Q.; Paris, M.; Lehmann, D.M.; Allen, D.; Choksi, N.; Matheson, J.; Jacobs, A.;
Casey, W.; Kleinstreuer, N. (2016b)
Multivariate models for prediction of human skin sensitization hazard
Journal of Applied Toxicology, in press,

Suzuki, M.; Hirota, M.; Hagino, S.; Itagaki, H.; Aiba, S. (2009)
Evaluation of changes of cell-surface thiols as a new biomarker for *in vitro* sensitization test
Toxicology In Vitro, 23, 687-696

Takahashi, T.; Kimura, Y.; Saito, R.; Nakajima, Y.; Ohmiya, Y.; Yamasaki, K.; Aiba, S. (2011)
An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8
Toxicological Sciences, 124, 359-369

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
Journal of Applied Toxicology, 35, 1318-1332

Teunis, M.; Corsini, E.; Smits, M.; Madsen, C.B.; Eltze, T.; Ezendam, J.; Galbiati, V.; Gremmer, E.; Krul,
C.; Landin, A.; Landsiedel, R.; Pieters, R.; Rasmussen, T.F.; Reinders, J.; Roggen, E.; Spiekstra, S.; Gibbs,
S. (2013)
Transfer of a two-tiered keratinocyte assay: IL-18 production by NCTC2544 to determine the skin
sensitizing capacity and epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency

Toxicology In Vitro, 27, 1135-1150

Teunis, M.A.T.; Spiekstra, S.W.; Smits, M.; Adriaens, E.; Eltze, T.; Galbiati, V.; Krul, C.; Landsiedel, R.; Pieters, R.; Reinders, J.; Roggen, E.; Corsini, E.; Gibbs, S. (2014)

International ring trial of the epidermal equivalent sensitizer potency assay: reproducibility and predictive-capacity

ALTEX - Alternativen zu Tierexperimenten, 31, 251-268

Troutman, J.A.; Foertsch, L.M.; Kern, P.S.; Dai, H.J.; Quijano, M.; Dobson, R.L.M.; Lalko, J.F.; Lepoittevin, J.-P.; Gerberick, G.F. (2011)

The incorporation of lysine into the peroxidase peptide reactivity assay for skin sensitization assessments

Toxicological Sciences, 122, 422-436

Tsujita-Inoue, K.; Atobe, T.; Hirota, M.; Ashikaga, T.; Kouzuki, H. (2015)

In silico risk assessment for skin sensitization using artificial neural network analysis

The Journal of Toxicological Sciences, 40, 193-209

Tsujita-Inoue, K.; Hirota, M.; Ashikaga, T.; Atobe, T.; Kouzuki, H.; Aiba, S. (2014)

Skin sensitization risk assessment model using artificial neural network analysis of data from multiple *in vitro* assays

Toxicology In Vitro, 28, 626-639

United Nations (2013)

Globally Harmonized System for the Classification and Labelling of Chemicals (GHS)

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

Regulatory Toxicology and Pharmacology, 71, 337-351

van der Veen, J.W.; Pronk, T.E.; van Loveren, H.; Ezendam, J. (2013)

Applicability of a keratinocyte gene signature to predict skin sensitizing potential

Toxicology In Vitro, 27, 314-322

van der Veen, J.W.; Rorije, E.; Emter, R.; Natsch, A.; van Loveren, H.; Ezendam, J. (2014)

Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals

Regulatory Toxicology and Pharmacology, 69, 371-379

Vocanson, M.; Achachi, A.; Mutez, V.; Cluzel-Tailhardat, M.; Varlet, B.L.; Rozieres, A.; Fournier, P.; Nicolas, J.F. (2014)

Human T cell priming assay: depletion of peripheral blood lymphocytes in CD25⁺ cells improves the *in vitro* detection of weak allergen-specific T cells

EXS, 104, 89-100

Wong, C.L.; Lam, A.L.; Smith, M.T.; Ghassabian, S. (2016)

Evaluation of a high-throughput peptide reactivity format assay for assessment of the skin sensitization potential of chemicals

Front Pharmacol, 7, 53

Yamamoto, Y.; Tahara, H.; Usami, R.; Kasahara, T.; Jimbo, Y.; Hioki, T.; Fujita, M. (2015)
A novel *in chemico* method to detect skin sensitizers in highly diluted reaction conditions
Journal of Applied Toxicology, 35, 1348-1360

GLOSSAR

Accuracy	„The closeness of agreement between test method results and accepted reference values. It is a measure of test method performance and one aspect of relevance. The term is often used interchangeably with “concordance” to mean the proportion of correct outcomes of a test method.” (entnommen aus (OECD, 2010))
ADRA-DM	„Amino acid derivative reactivity assay - dilution method“
ANN	„Artificial Neural Network“, künstliches neuronales Netzwerk, computergestütztes Modell zur (abstrakten) Informationsverarbeitung
AOP	„Adverse outcome pathway“ – “... sequence of events from chemical structure through the molecular initiating event to the <i>in vivo</i> outcome of interest. AOPs are representations of existing knowledge concerning the linkage(s) between a molecular initiating event and an adverse outcome at the individual or population level.” (entnommen aus OECD, 2012)
ARE	„antioxidativ-responsives Element“
BF	Bayes Faktor; Ein BF liefert eine Aussage über die Hinweisstärke einer gemachten Vorhersage aus einem Bayes’schen Netzwerk.
Bayes-Netzwerk	„bayesian network“; probabilistisches Expertensystem, welches mittels graphischer Darstellung (gerichteter, azyklischer Graph) komplexe Zusammenhänge von Zufallsvariablen und deren bedingten Abhängigkeiten darstellt. Jeder Knoten im Netz hat dabei eine bedingte Wahrscheinlichkeit. Im vorliegenden Fall wurde die Wahrscheinlichkeitsverteilung der beteiligten Variablen aus einem Set von <i>in vitro</i> , <i>in silico</i> und <i>in chemico</i> Daten berücksichtigt, um eine Wirkstärkeklasse gemäß der Kategorisierung von LLNA-Daten zu erzielen. Die entsprechenden Kategorien sind - nicht sensibilisierend, schwache, mittlere und hohe sensibilisierende Wirkstärke.
CAATC Assay	„Contact allergen activated T-cell assay“
CASRN	CAS-Registrierungsnummer (CAS = Chemical Abstracts Service)
CD	„Cluster of differentiation“
CLP	classification-labelling-and-packaging-of-substances-and-mixtures, Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (EU, 2008)
COLIPA	Dachverband der europäischen Kosmetikerhersteller (Cosmetics Europe-The Personal Care Association)
DEREK	Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge; ein wissens-basiertes (Q)SAR System
DIP	„Data interpretation procedure“

DPRA	„Direct Peptide Reactivity Assay“, Verfahren zur Messung der Proteinbindung
Draft guidance IR&CSA R.7a	Guidance on information requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R.7a: Endpoint specific guidance, Draft version 5.0, June 2016; Full revision Section R.7.3 Skin and Respiratory sensitisation. http://echa.europa.eu/support/guidance/consultation-procedure/ongoing-reach
DSA ₀₅	„induction dose per skin area (DSA) that produced a positive response in 5 % of the tested population“ (Flächendosis/Induktionsdosis pro Hautbereich; µg/cm ²)
ECHA	„European Chemicals Agency“, Europäische Chemikalienagentur
EE	Epidermis Äquivalenzmodell („epidermal equivalent“), z.B. epiCS [®] von CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH
EE-EC ₅₀	Konzentration, die die Anzahl lebender Zellen der humanen EE-Kultur um 50% reduziert
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“, Durchflusszytometrie, Verfahren zur Analyse von Zellmarkern
GARD	Genomic Allergen Rapid Detection
GMS	Wirkstärkekategorie „Geringe bis mäßige Sensibilisierungs-stärke (S)“, Definition: WoE geringe bis mäßige S und/oder geringe Humanevidenz
GPMT	Guinea pig maximisation test, Maximierungstest am Meerschweinchen, Adjunvans-Test
GSH	Gluthation
h-CLAT	„Human Cell Line Activation Test“, Prüfung der Reifung von dendritischen Zellen
HPLC	„High-performance liquid chromatography“; Analysemethode zur Quantifizierung
HPT	„Human Patch Test“
HRIPT	„Human Repeat Insult Patch Test“
HRP/P	Meerrettich-Peroxidase / Wasserstoffperoxid, Substrat im Peroxidase Peptide Reactivity Assay (PPRA)
HS	Wirkstärkekategorie „Hohe Sensibilisierungsstärke (S)“, Definition: WoE hohe S oder Unbekannt (Defaultannahme bei zu wenig Daten)
hTCPA	Humaner T-Zell Priming Assay
IATA	Integrated Approaches to Testing and Assessment; Definition der OECD: „ ..., an IATA follows an iterative process of information collection and the data gathered targets the generation of new data, when needed. The decision-making in an IATA is based on a weight-of-evidence approach.“

IC50	50 % Induktionskonzentration
id	intradermal
IFN γ	Interferon gamma
IL-1 α_{2x}	2fache Interleukin-1 Expression
<i>In chemico</i>	Testmethode, die im abiotischen System die chemische Reaktivität misst
<i>In silico</i>	Computerbasierte Vorhersage
<i>In vitro</i>	Bioassay auf zellulärer Ebene
<i>In vivo</i>	Tierversuche und Humanbefunde
iSENS	„integration <i>in vitro</i> sensitization tests version 2“; ITS zur Auswertung von <i>in vitro</i> Sensibilisierungsdaten (T sujita-Inoue et al., 2015; T sujita-Inoue et al., 2014)
ITS	integrierte Teststrategie; Definition der OECD: „ ITS and STS are so-called defined approaches to testing and assessment, which use a fixed data interpretation procedure (DIP) that is applied to data generated with a defined set of individual information sources.“
KE	„Key event“, Begriff aus der Terminologie für „Adverse outcome pathways“
KEAP1	Sensor-/Repressorprotein v.a. anti-oxidative Stressantwort und Entzündung; „Kelch-like ECH-associated protein 1“
K _{o/w}	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, log K _{o/w} ist ein einfaches Maß für die Bioverfügbarkeit (englisch LogP)
K _p	Permeabilitätskoeffizienten, ein einfaches Maß für die Hautdurchdringung
LCSA	„Loose-fit coculture-based Sensitization assay“ (siehe FP-0324, Teilprojekt 5.1)
LLNA	“Local lymph node assay“
LNCC	“Lymph node cell count assay“
logP	englisch für log K _{o/w}
MIE	„Molecular initiating event“, Begriff aus der Terminologie für „Adverse outcome pathways“
MS	Massenspektrometrie, Analysenmethode zum Messen der Masse von Atomen oder Molekülen
MUSST	„Myeloid U937 Skin Sensitisation Test“
MW	Molekulargewicht
NO(A)EL	„No Observed (Adverse) Effect Level“
Pos	positiv

PPRA	„Peroxidase Peptide Reactivity Assay“, Verfahren zur Messung der Proteinbindung, Weiterentwicklung des DPRA
QMM	quantitatives mechanistisches Modell
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerase chain reaction, Verfahren um die Genexpression eines zu untersuchenden Gens quantitative zu bestimmen
QSAR	quantitative Struktur–Wirkungsbeziehung (QSAR)
rLLNA	reduced local lymph node assay
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S	Sensibilisierungsstärke
SHS	Wirkstärkekategorie „Sehr hohe Sensibilisierungsstärke (S)“, Definition: Sehr hohe S im Tierversuch und/oder sehr hohe Humanevidenz
SH-Assay	Thiol-Assay, Prüfung der Reifung von dendritischen Zellen
SI	Stimulations Index
SN ₁	Nukleophile Substitutionsreaktion – monomolekularer Mechanismus
SN ₂	Nukleophile Substitutionsreaktion – bimolekularer Mechanismus
SOP	„Standard Operating Procedure“ / Standardarbeitsanweisung
STS	Sequential Testing Strategy, weitere Information siehe Eintrag zu ITS
TCR	„T cell receptor“
TIMES-SS	Tissue MEtabolism Simulator platform used for predicting Skin Sensitization; Expertensystem (Hybridsystem) zur Vorhersage der sensibilisierenden Substanzeigenschaften
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
top	topisch
U-SENS TM	„Myeloid U937 Skin Sensitization Test“, Nachfolgetest des MUSST, Prüfung der Reifung von dendritischen Zellen
UVCB	„Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials“
WoE	„weight of evidence“ Bewertung, Beweiskraftkonzept d.h. Bewertung auf Basis einer Gesamtschau der Daten und Gewichtung gemäß der jeweiligen Beweiskraft

IVDK Informationsverbund Dermatologischer Kliniken

Göttingen, 17. Oktober 2016

Forschungsvorhaben

**„Vergleichende gesundheitliche Bewertung von Epoxidharzsystemen
unter Berücksichtigung sensibilisierender Wirkstärke“**

gefördert aus Mitteln des Forschungsfonds der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung

Kennziffer FP-0384

Teilprojekt I

des Informationsverbundes Dermatologischer Kliniken (IVDK)

„Zusätzliche Humandaten – IVDK-Daten“

Prof. Dr. med. Johannes Geier
Dr. rer. nat. Holger Lessmann
Informationsverbund Dermatologischer Kliniken (IVDK)
Institut an der Universitätsmedizin Göttingen
Von-Bar-Str. 2-4
37075 Göttingen
Tel. 0551 / 505 39 625
e-mail: jgeier@gwdg.de
<http://www.ivdk.org>



Inhaltsverzeichnis

		Seite
0	Verzeichnis der Abkürzungen	3
1	Hintergrund und Zielsetzung der Datenanalyse	4
2	Material und Methoden	6
3	Ergebnisse	10
3.1	Epikutantest-Reaktionen auf DGEBA-Epoxidharz	10
3.2	Vergleich der klinischen und anamnestischen Daten von Patienten mit bzw. ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz	10
3.3	Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner	15
3.3.1	Reaktionshäufigkeiten allgemein sowie bei Patienten mit bzw. ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz	15
3.3.2	Reaktionskopplungen	18
3.4	Sensibilisierungen gegen Härter	22
3.4.1	Reaktionshäufigkeiten allgemein sowie bei Patienten mit bzw. ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz	22
3.4.2	Reaktionskopplungen	24
3.5	Sensibilisierungsmuster in definierten Subgruppen von Patienten	25
3.5.1	Maurer, Fliesenleger, Bauarbeiter usw.	25
3.5.2	Ingenieure, Mathematiker, Techniker, Architekten	28
3.5.3	Maler, Lackierer	31
3.5.4	Kunststoffverarbeiter	34
3.5.5	Zusammenfassung	36
3.6	Sonderfall 4,4'-Diaminodiphenylmethan	37
3.6.1	Reaktionshäufigkeiten und Begleitreaktionen	38
3.6.2	Klinische und anamnestische Daten der gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan sensibilisierten Patienten	40
4	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	41
5	Allergologische Bewertung der epikutan getesteten Komponenten von Epoxidharzsystemen an Hand der vorliegenden Daten	48
6	Literatur	50

Verzeichnis der Abkürzungen

1,4-BDDGE	1,4-Butandiol diglycidylether
1,6-HDDGE	1,6-Hexandiol diglycidylether
BGE	Butylglycidylether
CAS	Chemical Abstracts Service
CGE	Cresylglycidylether
DETA	Diethylentriamin
DGEBA	Diglycidylether of Bisphenol A (Bisphenol A-diglycidylether)
DGEBF	Diglycidylether of Bisphenol F (Bisphenol F-diglycidylether)
DKG	Deutsche Kontaktallergie-Gruppe
GISBAU	Gefahrstoff-Informations-System der Berufsgenossenschaft der Bauwirtschaft
IPDA	Isophorondiamin
IVDK	Informationsverbund Dermatologischer Kliniken
MXDA	m-Xylidendiamin
PGE	Phenylglycidylether
PTBPGE	p-tert-Butylphenylglycidylether
TMHDA	Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch)
TMPTGE	Trimethylolpropan triglycidylether
Vas.	Vaseline; in Vaseline

1. Hintergrund und Zielsetzung der Datenanalyse

Ziel des Forschungsvorhabens FP-0384 ist es, die erfolgreich abgeschlossene Arbeit des Forschungsvorhabens FP-0324 fortzuführen und weiter zu entwickeln, also Inhaltsstoffe von Epoxidharzsystemen gemäß ihrer jeweiligen sensibilisierenden Wirkstärke zu differenzieren. Hauptsächlich werden dabei Ergebnisse von in vitro-Untersuchungen berücksichtigt und wissenschaftliche Veröffentlichungen zur sensibilisierenden Wirkung auf der Basis von Tierversuchen, in vitro-Untersuchungen und in silico-Methoden (Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen) ausgewertet.

Im Rahmen des Teilprojekt I des IVDK werden diese Erkenntnisse um klinisch-epidemiologische Daten zur Sensibilisierung beim Menschen ergänzt.

Hierzu werden Daten des Informationsverbundes Dermatologischer Kliniken (IVDK) ausgewertet. Der IVDK betreibt die größte Faktendatenbank der Welt auf dem Gebiet der Kontaktallergie. An dem Verbund sind derzeit 56 dermatologische Abteilungen in Deutschland, der Schweiz und Österreich beteiligt. Der Gesamtbestand umfasst aktuell die Daten von ca. 250.000 epikutan getesteten Patienten (Stand Februar 2016). Jährlich kommen die Daten von etwa 12.000 weiteren Patienten hinzu.

Ein Epoxidharz auf Basis von Bisphenol A-diglycidylether (DGEBA) ist Bestandteil der Epikutantest-Standardreihe der Deutschen Kontaktallergie-Gruppe (DKG). Diese Reihe wird bei ca. 85% aller epikutan getesteten Patienten, also relativ breit, überprüft. Darüber hinaus werden weitere Komponenten von Epoxidharzsystemen, nämlich Amin-Härter und Reaktivverdünner, in speziellen Reihen gezielt epikutan getestet.

Der IVDK verfügt also über Daten zur Häufigkeit der Sensibilisierungen gegenüber DGEBA-Epoxidharz und weiteren Komponenten von Epoxidharzsystemen bei Ekzempatienten. Im Rahmen dieser retrospektiven Datenanalyse werden die entsprechenden Epikutantest-ergebnisse ausgewertet. Dabei werden auch Subgruppen von Patienten aus besonders von der Epoxidharz-Allergie betroffenen Berufen gesondert betrachtet.

Darüber hinaus werden Reaktionskopplungen ausgewertet, die wiederum mit bereits vorhandenen Kenntnissen über immunologische Kreuzreaktionen in Beziehung gesetzt werden. Auf diese Weise wird ermittelt, ob bestimmte Epoxidharzbestandteile eher selbst oder möglicherweise eher auf dem Boden immunologischer Kreuzreaktionen zu allergischen Reaktionen führen. Die Betrachtung von Kreuzreaktionen ist auch für das Ranking einzelner Bestandteile von Bedeutung, da ein kreuzreagierender Bestandteil eines Epoxidharzsystems allergologisch anders zu bewerten ist als eine allergologisch „isoliert“ reagierende Substanz.

Der Umfang der im Rahmen dieses Teilprojektes durchgeführten Datenauswertung ist geringer als im Vorgängerprojekt FP-0324, und zwar aus folgenden Gründen:

- Aufgrund des kürzeren Auswertungszeitraumes (4 vs. 10 Jahre) ist der Datenumfang, also die Zahl der getesteten Patienten bzw. der Patienten mit Epoxidharz-Allergie insgesamt geringer, so dass in einigen Subgruppen von Patienten keine signifikanten Ergebnisse erwarten werden können.
- Die Ergebnisse einiger Teile der umfangreichen Datenanalyse im Vorgängerprojekt erwiesen sich als wenig aussagekräftig in Bezug auf die Fragestellung des gesamten Forschungsvorhabens. Dies betrifft z.B. die Betrachtung der Gruppen von Patienten mit Reaktionen auf Reaktivverdünner oder Härter insgesamt (also ohne Differenzierung nach Einzelsubstanzen), die extensive Analyse von Begleitsensibilisierungen in einigen Subgruppen von Patienten, oder die Analyse von Sensibilisierungen gegen Komponenten von Epoxidharzsystemen in Subgruppen von Patienten, die durch die mutmaßliche Allergenquelle definiert sind. Daher wird jetzt auf derartige Auswertungen verzichtet.
- Es liegen keine neueren gesicherten Erkenntnisse zur Verbreitung der einzelnen Komponenten von Epoxidharzsystemen vor, wie z.B. die in Deutschland verkaufte bzw. verarbeitete Produktmenge oder die Zahl der Exponierten. Daher wird auf eine Wiederholung des im Vorgängerprojekt verfolgten Ansatzes verzichtet, in dem ein „Sensitization Exposure Quotient“ unter Zuhilfenahme der Anzahl der beim Gefahrstoff-Informationssystem der Berufsgenossenschaften der Bauwirtschaft vorliegenden Sicherheitsdatenblätter als Surrogat für die Verbreitung der einzelnen Komponenten berechnet wurde.

2. Material und Methoden

Die Grundlage dieser Datenauswertung sind Daten des IVDK der Jahre 2012 bis 2015, also des Zeitraums, der sich unmittelbar an die im Rahmen des FP-0324 ausgewertete Zeitspanne (2002 – 2011) anschließt. In diesen 4 Jahren (2012 – 2015) wurden in den 56 am IVDK beteiligten dermatologischen Abteilungen insgesamt 50.102 Patienten epikutan getestet.

Der IVDK ist ein Verbund dermatologischer Abteilungen, der sich der epidemiologischen Überwachung der Kontaktallergie widmet [Schnuch et al. 2012]. In den beteiligten Kliniken werden die Daten aller epikutan getesteten Patienten mit einem einheitlichen Computerprogramm standardisiert erfasst. Dabei werden nicht nur die durchgeführten Testungen und deren Ergebnisse dokumentiert, sondern auch anamnestische und klinische Angaben der Patienten [Schnuch et al. 2008 b]. Diese Daten werden in anonymisierter Form in halbjährlichen Abständen an die Zentrale des IVDK an der Universitätsmedizin Göttingen übermittelt. Dort werden sie einer Qualitätskontrolle unterzogen und in die zentrale Datenbank des IVDK aufgenommen [Uter et al. 2005]. Das Datenmanagement erfolgt mit dem Programmpaket SAS 9.4 (SAS-Institut, Cary, NC, USA).

In den beteiligten Zentren werden die Epikutantestungen nach den Leitlinien der Deutschen Kontaktallergie-Gruppe (DKG) vorgenommen und abgelesen [Schnuch et al. 2008 a]. Abgesehen von einigen (temporären) Ausnahmen wurden im Auswertungszeitraum für die Epikutantestung Finn Chambers on Scanpor® verwendet. Die Testallergene wurden bis auf wenige Ausnahmen von der Firma Almirall Hermal, Reinbek (bis 31.12.2013), bzw. SmartPractice Europe, Greven / Reinbek (ab 01.01.2014), sowie von der Firma Chemotechnique, Vellinge, Schweden, bezogen.

Für die Datenanalyse wurden die Testreaktionen am Tag 3 ausgewertet. In einigen wenigen Fällen wurde die Epikutantestung nicht am Tag 3, sondern am Tag 4 abgelesen. In diesen Fällen wurde die Reaktion am Tag 4 zur Auswertung herangezogen. Für die Ermittlung der Quote positiver Reaktionen wurden alle Reaktionen, die als +, ++ oder +++ dokumentiert sind, zusammengefasst.

Wo es sinnvoll war, wurden Häufigkeitsunterschiede bei Reaktionsquoten oder dem Auftreten bestimmter Merkmale in disjunkten Subgruppen von Patienten mit dem χ^2 -Test auf statistische Signifikanz geprüft. Die Prüfung erfolgte auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$.

Die in Tabelle 2.1 aufgeführten Komponenten von Epoxidharzsystemen waren im Untersuchungszeitraum Bestandteile der Epikutantestreihen der DKG und sind in der vorliegenden Datenanalyse berücksichtigt worden.

Tabelle 2.1:

Im Untersuchungszeitraum im IVDK epikutan getestete und in der Datenanalyse berücksichtigte Komponenten von Epoxidharzsystemen. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	CAS Nr.	Testkonzentration
Harze		
Bisphenol A-Epoxidharz (DGEBA-Harz)	25068-38-6	1 %
Reaktivverdünner		
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	16096-31-4	0,25 %
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	2425-79-8	0,25 %
Butylglycidylether (BGE)	2426-08-6	0,25 %
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	30499-70-8	0,25 %
Phenylglycidylether (PGE)	122-60-1	0,25 %
Cresylglycidylether (CGE)	26447-14-3	0,25 %
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	3101-60-8	0,25 %
Härter		
m-Xylidendiamin (MXDA)	1477-55-0	0,1 %
Isophorondiamin (IPDA)	2855-13-2	0,5 %
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	25620-58-0	0,5 %
Diethylentriamin (DETA)	111-40-0	1 %
4,4'-Diaminodiphenylmethan	101-77-9	0,5 %

Das DGEBA-Epoxidharz war während des gesamten Untersuchungszeitraumes Bestandteil der DKG-Standardreihe, die bei 43.872 Patienten (87,6 % der gesamten Testpopulation) getestet wurde. Alle anderen in Tabelle 2.1 aufgeführten Testsubstanzen waren während des Untersuchungszeitraumes Bestandteil der DKG-Testreihe „Kunstharze / Kleber“, die bei 5.101 Patienten (10,2 % der gesamten Testpopulation) getestet wurde.

Auf eine ausführliche Diskussion jeder einzelnen der angegebenen Komponenten von Epoxidharzsystemen *anhand der allergologischen Literatur* wurde in diesem Teilprojekt verzichtet, da dies der Inhalt des Teilprojektes II des IVDK „Zusätzliche Humandaten – Literaturstudie über allergologische Humanbefunde zu Inhaltsstoffen von Epoxidharzsystemen“ des Forschungsvorhabens FP-0384 ist.

Einige weitere der im Rahmen dieses Forschungsvorhaben (FP-0384) bearbeiteten Komponenten von Epoxidharzsystemen wurden entweder ausschließlich in anderen DKG-Testreihen als der Reihe „Kunstharze/Kleber“ oder nur in begrenztem Umfang getestet (siehe Tabelle 2.2):

- Ethylendiamin wird nicht nur in Epoxidharzsystemen, sondern vor allem auch als Hilfsstoff in Medikamenten verwendet. Früher hatte es außerdem eine Bedeutung als Stabilisator in der Latexverarbeitung und als Hilfsstoff in Schmierstoffen. Daher war (und ist) es Bestandteil verschiedener DKG-Testreihen wie einer speziellen Arzneistoff-Reihe, einer historischen Kühlschmierstoffreihe, der Gummireihe und der Testreihe „Leder und Schuhe“. Ethylendiamin war nur bis 1993 in einer Kunststoffreihe der DKG enthalten.
- Weitere Komponenten von Epoxidharzsystemen wurden zum Teil nur temporär und nur in einzelnen Kliniken getestet und führten dabei nur selten zu positiven Reaktionen.

Die Daten zu diesen Allergenen sind aufgrund der speziellen Testindikation, der geringen Reaktionshäufigkeiten und der nur temporären und regionalen Testungen unter epidemiologischen Aspekten nicht im selben Maße verwertbar wie die Ergebnisse der Testungen mit den in Tabelle 2.1 aufgeführten Komponenten von Epoxidharzsystemen, und werden daher bei der weiteren Datenanalyse nicht berücksichtigt.

Tabelle 2.2:

Komponenten von Epoxidharzsystemen, die im Untersuchungszeitraum im IVDK entweder nur in anderen Testreihen als der Reihe „DKG Kunstharze/Kleber“ oder aber nur temporär und regional unterschiedlich häufig epikutan getestet wurden. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	CAS Nr.	Test-konz.	Quote positive Reaktionen
Bisphenol F-Epoxidharz (DGEBF-Harz)	9003-36-5	0,25 %	11 / 109 = 10,1 %
Ethylendiamin-di-HCl	107-15-3*	1 %	47 / 14.721 = 0,3 %
Triethylentetramin	112-24-3	0,5 %	3 / 541 = 0,6 %
p-tert-Butylphenol	98-54-4	1 %	6 / 2721 = 0,2 %
Bisphenol A (4,4'-Isopropylidendiphenol)	80-05-7	1 %	0 / 1.069 = 0,0 %

* 107-15-3 ist die CAS Nr. von Ethylendiamin, das aber als Dihydrochlorid (CAS Nr. 333-18-6) getestet wird

Positive Reaktionen auf Bisphenol A-Epoxidharz wurden bei 10 der 11 Patienten beobachtet, die auch gegen DGEBA-Epoxidharz sensibilisiert sind, was auf zwei bekannte Ursachen zurückzuführen ist, nämlich (1) immunologische Kreuzreaktionen und (2) Ko-Sensibilisierung durch Ko-Exposition.

Bei den meisten der positiven Reaktionen auf Ethylendiamin-di-HCl handelte es sich um Zufallsbefunde, deren klinische Relevanz unklar blieb. Nur 2 Reaktionen wurden bei Patienten mit Sensibilisierung gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA beobachtet.

Die Sensibilisierungen gegen Triethylentetramin und p-tert-Butylphenol traten durchweg bei Patienten ohne Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz auf.

3. Ergebnisse

3.1. Epikutantest-Reaktionen auf DGEBA-Epoxidharz

Die Testzubereitung mit einem Epoxidharz auf der Basis von Bisphenol A-diglycidylether (DGEBA-Harz) 1% in Vaseline (Vas.) wurde im Untersuchungszeitraum (2012 – 2015) bei 42.735 Patienten getestet. Dies entspricht 85,3% aller epikutan getesteten Patienten. Die Reaktionen an Tag 3 sind in Tabelle 3.1.1 aufgeführt. Insgesamt ergaben sich bei 743 Patienten positive Reaktionen, das entspricht einer Reaktionsquote von 1,74%. Der Reaktions-Index liegt bei 0,44, die Positivity Ratio bei 55,5%. Damit erweist sich die Testzubereitung als sehr gut geeignet, um allergische Reaktionen zu diagnostizieren und von fraglichen und irritativen Reaktionen zu differenzieren [Geier et al. 2003, Geier et al. 2010].

Tabelle 3.1.1:

IVDK, 2012-2015, Reaktionen auf Epoxidharz auf Basis von DGEBA, 1 % Vas.

Reaktion	Anzahl	Prozent
negativ	41.704	97,6
fraglich	199	0,5
follikulär	28	0,1
+	412	1,0
++	241	0,6
+++	90	0,2
irritativ	61	0,1
Summe	42.735	100,0

3.2. Vergleich der klinischen und anamnestischen Daten von Patienten mit bzw. ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz

Um typische Merkmale der Patientenpopulation mit Epoxidharz-Allergie zu identifizieren, wurden die Patienten mit positiver Reaktion auf DGEBA-Harz denen mit negativer Reaktion auf DGEBA-Harz gegenübergestellt. Die Patienten mit fraglicher oder irritativer Reaktion wurden bei diesem Vergleich nicht berücksichtigt. Zwar handelt es sich bei den meisten dieser Reaktionen wahrscheinlich um unspezifische (irritative) Reaktionen; im Einzelfall kann aber auch eine schwach ausgeprägte allergische Reaktion vorliegen. Der Sensibilisierungsstatus dieser Patienten ist also nicht eindeutig und könnte daher das Bild verwässern.

Tabelle 3.2.1 enthält die Beschreibung der beiden Populationen mit dem sogenannten MOAHLFA-Index [Schnuch et al. 1997]. Man erkennt unter den Epoxidharz-positiven Patienten einen erheblich und signifikant erhöhten Anteil von Männern (49,7% vs. 36,0%) und von Patienten mit Berufsdermatose (35,1% vs. 16,4%). Auch Patienten mit Handekzem und Patienten ab 40 Jahre sind unter den Epoxidharz-Positiven signifikant vermehrt vertreten (33,9% vs. 30,2% bzw. 76,6% vs. 72,7%); die Unterschiede sind jedoch weit geringer. Der Anteil von Patienten mit atopischer Dermatitis ist unter den Epoxidharz-Positiven signifikant verringert (18,8% vs. 23,9%). Bezüglich der Anteile von Patienten mit Beineczem und Gesichtsekzem ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 3.2.1:

MOAHLFA-Index der Patienten mit positiver Reaktion (n=743) und der Patienten mit negativer Reaktion (n=41.704) auf Epoxidharz auf Basis von DGEBA, 1 % Vas.

	Epoxidharz-Positive	Epoxidharz-Negative	Chi ² -Test p-Wert
Männer	49,7 %	36,0 %	< 0,0001
Berufsdermatose	35,1 %	16,4 %	< 0,0001
Atopische Dermatitis	18,8 %	23,9 %	0,0015
Handekzem	33,9 %	30,2 %	0,0309
Beineczem	8,9 %	10,6 %	0,1311
Gesichtsekzem	19,0 %	16,9 %	0,1290
Alter >= 40 Jahre	76,6 %	72,7 %	0,0194

Tabelle 3.2.2 stellt die häufigsten aktuellen Berufe der Patienten der beiden Gruppen gegenüber. Man erkennt unter den Patienten mit positiver Reaktion auf DGEBA-Harz einen erheblich erhöhten Anteil von Malern und Lackierern (3,5% vs. 0,6%), Laminierern (1,9% vs. < 0,1%), Bauhilfsarbeitern (1,6% vs. 0,1%), Technikern (sonstige) (1,5% vs. 0,5%), Maurern (1,3% vs. 0,3%) und Fußbodenlegern (1,3% vs. < 0,1%).

Dieses Bild spiegelt sich auch wider, wenn man die Berufe zu Gruppen zusammenfasst, wie es in Tabelle 3.2.3 wiedergegeben ist. Folgende Berufsgruppen sind unter den Epoxidharz-Positiven erheblich und signifikant vermehrt vertreten: Maurer, Fliesenleger, Bauarbeiter usw. (6,6% vs. 0,7%; Chi²-Test p < 0,0001), Maler und Lackierer (3,6% vs. 0,7%; p < 0,0001) und Kunststoffverarbeiter (2,8% vs. 0,2%; p < 0,0001%). Auch die Gruppe „Ingenieure, Mathematiker, Techniker, Architekten“ war signifikant häufiger vertreten (4,8% vs. 2,3%; p < 0,0001). Bei allen anderen Berufsgruppen ergaben sich entweder keine signifikanten Häufungen unter den Epoxidharz-Positiven, oder sie waren dort sogar in geringerer Zahl vertreten.

Tabelle 3.2.2:

Die häufigsten aktuellen Berufe der Patienten mit positiver Reaktion (n=743) und der Patienten mit negativer Reaktion (n=41.704) auf Epoxidharz auf Basis von DGEBA, 1 % Vas. Es sind alle Berufe angegeben, die in einer der beiden Gruppen bei mindestens 1% der Patienten genannt wurden.

Berufe	Epoxidharz-Positive	Epoxidharz-Negative
Rentner	21,3 %	25,9 %
Keine nähere Angabe	7,0 %	8,5 %
Bürofachkraft	5,5 %	7,7 %
Hausfrau	4,4 %	6,1 %
Maler, Lackierer	3,5 %	0,6 %
Laminierer	1,9 %	< 0,1 %
Bauhilfsarbeiter	1,6 %	0,1 %
Arbeitslos	1,5 %	1,8 %
Techniker (sonstige)	1,5 %	0,5 %
Mechaniker (sonstige)	1,3 %	1,1 %
Maurer	1,3 %	0,3 %
Fußbodenleger	1,3 %	< 0,1 %
Raumreiniger	1,3 %	1,8 %
Student	1,2 %	2,0 %
Verkäufer (ohne nähere Angabe)	1,2 %	1,6 %
Altenpflegerin	0,9 %	1,4 %
Krankenschwester, -pfleger	0,8 %	2,6 %
Friseur	0,7 %	1,5 %

Tabelle 3.2.3:

Die häufigsten Gruppen der aktuellen Berufe der Patienten mit positiver Reaktion (n=743) und der Patienten mit negativer Reaktion (n=41.704) auf Epoxidharz auf Basis von DGEBA, 1 % Vas. Es sind alle Berufsgruppen angegeben, die in einer der beiden Patientengruppen bei mindestens 2 % der Patienten genannt wurden.

Berufsgruppen	Epoxidharz-Positive	Epoxidharz-Negative
Tätigkeiten mit unbestimmter Exposition	29,3 %	37,7 %
Büroberufe	8,3 %	12,8 %
Maurer, Fliesenleger, Bauarbeiter usw.	6,6 %	0,7 %
Hausfrauen, Hauswirtschafterinnen	5,5 %	6,6 %
Mechaniker, Maschinisten, Werkzeugmacher	4,8 %	3,8 %
Ingenieure, Mathematiker, Techniker, Architekten	4,8 %	2,3 %
Maler, Lackierer	3,6 %	0,7 %
Sozialpflegerische Berufe, Lehrer, Seelsorger u.ä.	3,5 %	3,0 %
Übrige Gesundheitsdienstberufe	3,1 %	6,5 %
Kunststoffverarbeiter	2,8 %	0,2 %
Fehlende Angabe	2,6 %	2,7 %
Raumreiniger	1,3 %	2,0 %

Frühere Berufe waren nur bei 66 Patienten mit positiver Reaktion auf Epoxidharz (8,9%) und 3.033 der Patienten mit negativer Reaktion auf Epoxidharz (7,3%) angegeben. Auf weitere Auswertungen wurde wegen der geringen Fallzahl Epoxidharz-positiver Patienten verzichtet.

Tabelle 3.2.4 zeigt einen Vergleich der mutmaßlichen Allergenquellen bei Patienten mit positiver Reaktion und Patienten mit negativer Reaktion auf DGEBA-Harz. In der Dokumentation des IVDK können bis zu 3 Bereiche angegeben werden, in denen die auslösenden Allergene vermutet werden. Erwartungsgemäß sind unter den Patienten mit positiver Reaktion auf DGEBA-Harz folgende Kontaktstoffkategorien deutlich und signifikant häufiger vertreten: Kleber (14,3% vs. 2,0%; $p < 0,0001$), Kunststoffe (9,6% vs. 1,9%; $p < 0,0001$), Baustoffe (8,9% vs. 1,7%; $p < 0,0001$), sowie Farben und Lacke (5,1% vs. 1,4%; $p < 0,0001$). Aufgrund der Auswahlmöglichkeit von bis zu drei mutmaßlichen Allergenquellen ergaben sich Überlappungen in diesen Bereichen. So waren z.B. unter den 106 Epoxidharz-positiven Patienten mit „Kleber“ als mutmaßlicher Allergenquelle jeweils 17 mit der weiteren Angabe „Kunststoffe“ und „Baustoffe“ und 13 mit der Angabe „Farben, Lacke“.

Tabelle 3.2.4:

Mutmaßliche Allergenquellen bei Patienten mit positiver Reaktion (n=743) und Patienten mit negativer Reaktion (n=41.704) auf Epoxidharz auf Basis von DGEBA, 1 % Vas. In der IVDK-Dokumentation können bis zu 3 entsprechende Bereiche angegeben werden. Es sind alle Kontaktstoffkategorien angegeben, die in einer der beiden Patientengruppen bei mindestens 2 % der Patienten genannt wurden.

Kontaktstoff-Kategorie	Epoxidharz-Positive	Epoxidharz-Negative
Kosmetika, Cremes, Lichtschutzmittel	33,4 %	42,2 %
Kleber	14,3 %	2,0 %
Medikamente, äußerlich	10,6 %	14,5 %
Kunststoffe	9,6 %	1,9 %
Baustoffe (Zement, Fliesenkleber...)	8,9 %	1,7 %
Handschuhe (Leder, Gummi, Stoff...)	7,8 %	7,9 %
Gummi (sonstiges)	6,6 %	6,8 %
Farben, Lacke	5,1 %	1,4 %
Desinfektionsmittel	5,0 %	8,5 %
Seife, Duschgel, Shampoo, Zahncreme...	4,8 %	8,2 %
Zahnprothesen, -brücken, -spangen	4,8 %	4,9 %
Implantate, Osteosynthesematerial (Metall)	4,7 %	5,1 %
Medikamente, innerlich	4,7 %	6,2 %
Zahnfüllungsmaterialien (Amalgam usw...)	3,2 %	3,4 %
Kühlschmierstoffe	3,2 %	3,6 %
Entfällt / keine Angaben	3,1 %	3,1 %
Metalle (Verarbeitung, z.B. Dreher usw.)	3,0 %	3,0 %
Kleidung, Textilien	2,8 %	3,5 %
Parfüm, Deo, Rasierwasser...	2,8 %	3,5 %
Sonstiges	2,6 %	3,4 %
Chemikalien (sonstige)	2,0 %	1,4 %

Unter den aktuellen Hauptabschlussdiagnosen ist bei den Patienten mit positiver Reaktion auf das DGEBA-Harz das allergische Kontaktekzem mit 48,0% deutlich häufiger vertreten als in der Gruppe der Epoxidharz-negativen (26,7%). Dies ist allerdings auch durch die Definition der Patientengruppen bedingt, da die Epoxidharz-Positiven mindestens eine Sensibilisierung haben (nämlich gegen DGEBA-Harz); in der Gruppe der Epoxidharz-Negativen dagegen sind auch Patienten, bei denen gar keine Sensibilisierung nachgewiesen wurde. Trotz der kleinen Fallzahl ist es bemerkenswert, dass 2,3% der Epoxidharz-positiven Patienten (n=17) ein aerogenes Kontaktekzem (airborne dermatitis) hatten, während dies in der Vergleichsgruppe nur bei 0,6% der Fall war.

3.3. Sensibilisierung gegen Reaktivverdünner

3.3.1 Reaktionshäufigkeiten allgemein, sowie bei Patienten

mit bzw. ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz

Im Untersuchungszeitraum wurden 4 aliphatische und 3 aromatische Glycidylether in größerem Umfang im IVDK epikutan getestet (siehe Tabelle 2.1). Abgesehen von Phenylglycidylether, der bei knapp 8.000 Patienten getestet wurde, beliefen sich die Testzahlen auf knapp 5.700 Patienten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3.1.1 zusammengestellt.

Tabelle 3.3.1.1:
IVDK, 2012-2015: Reaktionen auf Reaktivverdünner.
Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	0,25 %	5.686	180	3,2%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	0,25 %	5.684	142	2,5%
Butylglycidylether (BGE)	0,25 %	5.686	42	0,7%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	0,25 %	5.691	27	0,5%
Phenylglycidylether (PGE)	0,25 %	7.916	121	1,5%
Cresylglycidylether (CGE)	0,25 %	5.763	60	1,0%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	0,25 %	5.689	83	1,5%

Bei weitem nicht alle der mit den Reaktivverdünnern getesteten Patienten sind gegen DGEBA-Epoxidharz sensibilisiert. Oft werden bei entsprechendem Verdacht weitere Komponenten von Epoxidharzsystemen von vornherein epikutan getestet, und nicht erst dann, wenn bei der Testung mit der Standardreihe eine Epoxidharz-Sensibilisierung festgestellt wurde.

Andererseits werden Reaktivverdünner bei weitem auch nicht bei jedem Patienten mit positiver Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz getestet. In den Jahren 2012 bis 2015 war dies im IVDK bei nur ca. 275 der 743 Patienten (ca. 37%) der Fall.

Die Testreaktionen auf die Reaktivverdünner bei den Patienten mit nachgewiesener Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz sind in Tabelle 3.3.1.2 dargestellt.

Tabelle 3.3.1.2:

IVDK, 2012-2015, Patienten mit positiver Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (n=743):
Reaktionen auf Reaktivverdünner. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	0,25 %	273	133	48,7%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	0,25 %	272	96	35,3%
Butylglycidylether (BGE)	0,25 %	274	25	9,1%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	0,25 %	273	20	7,3%
Phenylglycidylether (PGE)	0,25 %	297	90	30,3%
Cresylglycidylether (CGE)	0,25 %	274	43	15,7%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	0,25 %	274	73	26,6%

Durch die erwähnten „a priori-Testungen“ von Komponenten von Epoxidharzsystemen im Verdachtsfall liegen auch Daten zur Sensibilisierung gegen Reaktivverdünner bei Patienten ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz vor. Sie sind in Tabelle 3.3.1.3 wiedergegeben.

Tabelle 3.3.1.3:

IVDK, 2012-2015, Patienten mit negativer Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (n=41.704):
Reaktionen auf Reaktivverdünner. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	0,25 %	4.990	30	0,6%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	0,25 %	4.989	31	0,6%
Butylglycidylether (BGE)	0,25 %	4.991	10	0,2%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	0,25 %	4.985	5	0,1%
Phenylglycidylether (PGE)	0,25 %	7.044	21	0,3%
Cresylglycidylether (CGE)	0,25 %	5.061	11	0,2%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	0,25 %	4.988	2	0,0%

Um zu ermitteln, wie häufig Sensibilisierungen gegen DGEBA-Epoxidharz mit Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner gekoppelt sind, und wie oft Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner „isoliert“, also ohne Epoxidharz-Allergie auftreten, wird in Tabelle 3.3.1.4 angegeben, wieviel Prozent der Patienten mit Sensibilisierung gegen einen Reaktivverdünner zusätzlich auf DGEBA-Epoxidharz reagierten und wie viel Prozent keine Reaktion auf DGEBA-Harz aufwies. Die Patienten mit fraglichen Reaktionen auf das Harz blieben hier ausgeschlossen, weil unklar ist, ob es sich bei diesen Reaktionen um unspezifische Irritationen handelt oder möglicher Weise doch um schwach ausgeprägte Sensibilisierungen. Die Testzahlen weichen von denen in Tabelle 3.3.1.1 ab, weil hier nicht *alle* getesteten Patienten berücksichtigt wurden, sondern nur diejenigen, bei denen außer dem jeweiligen Reaktivverdünner auch das DGEBA-Epoxidharz getestet wurde.

Tabelle 3.3.1.4:

Patienten mit positiver Reaktion auf Reaktivverdünner unter den mit DGEBA-Epoxidharz getesteten Patienten (n=42.735): Reaktionen auf DGEBA-Epoxidharz.

Substanz [Testzahl]	Pat. mit positiver Reaktion	davon positiv auf DGEBA-Harz		davon negativ auf DGEBA-Harz	
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE) [5.302]	165	133	80,6%	30	18,2%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE) [5.300]	129	96	74,4%	31	24,0%
Butylglycidylether (BGE) [5.304]	36	25	69,4%	10	27,8%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE) [5.297]	25	20	80,0%	5	20,0%
Phenylglycidylether (PGE) [7.395]	113	90	79,6%	21	18,6%
Cresylglycidylether (CGE) [5.374]	56	43	76,8%	11	19,6%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE) [5.301]	75	73	97,3%	2	2,7%

Man kann zusammenfassend festhalten, dass 1,6-Hexandioldiglycidylether und 1,4-Butandioldiglycidylether die häufigsten Sensibilisatoren unter den Reaktivverdünnern sind, gefolgt von Phenylglycidylether und p-tert-Butylphenylglycidylether. Unter den gegen DGEBA-Epoxidharz sensibilisierten Patienten waren Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner erwartungsgemäß erheblich häufiger als unter den Patienten ohne Epoxidharz-Allergie. Etwa 18-25% der Sensibilisierung gegen Reaktivverdünner – mit Ausnahme von p-tert-Butylphenylglycidylether – treten ohne Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz auf, was unterstreicht,

dass es sinnvoll ist, im Verdachtsfall Reaktivverdünner von vornherein mit zu testen. Insgesamt weichen die Ergebnisse nicht von denen der Vorgängerstudie (FP-0324) ab.

Phenylglycidylether (PGE) wird seit Jahren praktisch nicht mehr in Epoxidharzsystemen eingesetzt. Die meisten Sensibilisierungen gegen PGE erklären sich durch immunologische Kreuzreaktionen bei primärer Sensibilisierung gegen das DGEBA-Harz [Pontén et al. 2004]. Wie Tabelle 3.3.1.4 zu entnehmen ist, wurden aber auch 21 gegen PGE sensibilisierte Patienten gefunden, die im Epikutantest *nicht* auf das DGEBA-Harz reagiert haben. Eine nähere Analyse der klinischen und anamnestischen Daten dieser 21 Patienten ergab keine auffälligen Besonderheiten oder Hinweise, die das Testergebnis erklären würden. Elf dieser 21 Patienten reagierten im Epikutantest positiv auf einen oder mehrere weitere Reaktivverdünner, nämlich 8 auf 1,4-BDDGE, 7 auf 1,6-HDDGE, und jeweils 5 auf BGE und CGE.

Die Datengrundlage ist homogener als im Vorgängerprojekt, wahrscheinlich weil alle untersuchten Glycidylether während der gesamten Dauer des jetzigen Untersuchungszeitraumes Bestandteile der DKG-Testreihe „Kunstharze / Kleber“ waren, die meist vollständig getestet wurde. Die Reaktionsquoten auf die einzelnen Glycidylether weichen zum Teil etwas von der Voruntersuchung ab, was sicherlich durch unterschiedliche Patientenselektion bedingt ist, und keinen Trend zur Zu- oder Abnahme der Sensibilisierungen gegen bestimmte Glycidylether beweist. In der Regel sind die Reaktionsquoten, bedingt durch eine liberalere Indikation zur Testung, niedriger als in der Voruntersuchung.

Angesichts der hohen Quoten von Sensibilisierungen gegen p-tert-Butylphenylglycidylether unter den Epoxidharzallergikern ist es sehr bedauerlich (und unverständlich), dass SmartPractice die entsprechende Testzubereitung für den Epikutantest seit dem 01.01.2016 nicht mehr anbietet. Dieser Reaktivverdünner ist somit überhaupt nicht mehr als Epikutantestsubstanz erhältlich und musste daher zum 01.04.2016 aus den DKG-Testreihen gestrichen werden.

3.3.2 Reaktionskopplungen

Aus der Vorgängerstudie ist bekannt, dass es Reaktionskopplungen unter den aromatischen und den aliphatischen Glycidylethern gibt, die sehr wahrscheinlich überwiegend als immunologische Kreuzreaktionen zu deuten sind.

Im aktuellen Datenbestand (2012 - 2015) ergibt sich das in den Tabelle 3.3.2.1 und 3.3.2.2 dargestellte Muster.

1,6-HDDGE und 1,4-BDDGE wurden bei insgesamt 5.680 Patienten gleichzeitig epikutan getestet. 178 Patienten (3,1%) reagierten positiv auf 1,6-HDDGE, und 142 Patienten (2,5%) auf 1,4-BDDGE. 119 Patienten reagierten auf beide Glycidylether, das sind 67% der Patienten mit positiver Reaktion auf 1,6-HDDGE bzw. 84% der Patienten mit positiver Reaktion 1,4-BDDGE.

BGE und 1,4-BDDGE wurden bei 5.690 Patienten gleichzeitig getestet. 142 Patienten (2,5%) reagierten positiv auf 1,4-BDDGE, und 41 Patienten (0,7%) auf BGE. 34 Patienten reagierten auf beide Glycidylether, das sind 24% der Patienten mit positiver Reaktion auf 1,4-BDDGE bzw. 83% der Patienten mit positiver Reaktion BGE.

PGE und CGE wurden bei 5.690 Patienten parallel epikutan getestet. 112 Patienten (2,0%) reagierten positiv auf PGE, und 59 Patienten (1,0%) positiv auf CGE. 47 Patienten reagierten auf beide Glycidylether, das sind 42% der Patienten mit positiver Reaktion auf PGE bzw. 80% der Patienten mit positiver Reaktion auf CGE.

Bei insgesamt 5.681 Patienten wurden PGE und PTBPGE parallel epikutan getestet. 112 Patienten (2,0%) reagierten auf PGE, und 83 Patienten (1,5%) positiv auf PTBPGE. Auf beide Glycidylether reagierten 45 Patienten positiv, das sind 54% der Patienten mit positiver Reaktion auf PTBPGE bzw. 40% der Patienten mit positiver Reaktion auf PGE.

CGE und PTBPGE wurden bei 5.680 Patienten parallel getestet. 60 Patienten (1,1%) reagierten positiv auf CGE, und 83 Patienten (1,5%) positiv auf PTBPGE. 26 Patienten reagierten auf beide Glycidylether, das sind 43% der Patienten mit positiver Reaktion auf CGE bzw. 31% der Patienten mit positiver Reaktion auf PTBPGE.

Die Reaktionskopplungen zwischen den einzelnen Glycidylethern decken sich mit den Daten der Vorgängerstudie.

Tabelle 3.3.2.1:
 Ergebnisse paralleler Testungen mit verschiedenen, chemisch verwandten Glycidylethern.

		1,4-BDDGE		
		pos.	neg., fragl., ir.	Summe
1,6-HDDGE	pos.	119	59	178
	neg., fragl., ir.	23	5.479	5.502
	Summe	142	5.538	5.680
		1,4-BDDGE		
		pos.	neg., fragl., ir.	Summe
BGE	pos.	34	7	41
	neg., fragl., ir.	108	5.529	5.639
	Summe	142	5.536	5.678
		CGE		
		pos.	neg., fragl., ir.	Summe
PGE	pos.	47	65	112
	neg., fragl., ir.	12	5.566	5.578
	Summe	59	5.631	5.690
		PTBPGE		
		pos.	neg., fragl., ir.	Summe
PGE	pos.	45	67	112
	neg., fragl., ir.	38	5.531	5.569
	Summe	83	5.598	5.681
		PTBPGE		
		pos.	neg., fragl., ir.	Summe
CGE	pos.	26	34	60
	neg., fragl., ir.	57	5.563	5.620
	Summe	83	5.597	5.680

Tabelle 3.3.2.2:

Reaktionskopplungen zwischen PGE, CGE und PTBPGE bei 5.678 Patienten, bei denen alle drei Glycidylether parallel getestet wurden. Positive Reaktionen wurden als „+“ abgekürzt; negative, fragliche und irritative Reaktionen wurden unter „-“ subsummiert.

PGE	CGE	PTBPGE	Anzahl	Prozent
+	-	-	44	0,8
+	+	-	23	0,4
+	-	+	21	0,4
+	+	+	24	0,4
-	+	-	10	0,2
-	+	+	2	0,0
-	-	+	36	0,6
-	-	-	5.518	97,2

Auch die in Tabelle 3.3.2.2 dargestellten Reaktionskombinationen zwischen den drei aromatischen Glycidylethern PGE, CGE und PTBPGE unterscheiden sich – bei insgesamt etwas niedrigeren Reaktionsquoten aufgrund der liberaleren Testindikation – nicht wesentlich von den Daten der Vorgängerstudie.

Während isolierte Reaktionen auf PGE und PTBPGE mit 44 bzw. 36 von 160 insgesamt beobachteten positiven Reaktionen (27,5% bzw. 22,5%) relativ häufig sind, kommen isolierte Reaktionen auf CGE deutlich seltener vor (10 von 160 positive Reaktionen = 6,25%). Reaktionen auf CGE sind meist kombiniert mit Reaktionen auf PGE und/oder PTBPGE. Von den 44 Patienten mit isolierter Reaktion auf PGE reagierten 32 (73%) auf DGEBA-Harz.

3.4. Sensibilisierung gegen Härter

3.4.1 Reaktionshäufigkeiten allgemein, sowie bei Patienten

mit bzw. ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz

Im Untersuchungszeitraum wurden 4 Amin-Härter in größerem Umfang im IVDK epikutan getestet (siehe Tabelle 2.1). Insgesamt wurden ca. 5.700 Patienten mit diesen Härtern getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4.1.1 zusammengestellt.

Tabelle 3.4.1.1:
IVDK, 2012-2015: Reaktionen auf Amin-Härter.
Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
m-Xylidendiamin (MXDA)	0,1 %	5.694	84	1,5%
Isophorondiamin (IPDA)	0,5 %	5.791	41	0,7%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	0,5 %	5.690	42	0,9%
Diethylentriamin (DETA)	1 %	5.730	47	0,8%

Analog zu der Situation bei den Glycidylethern sind erwartungsgemäß auch bei weitem nicht alle der mit den Härtern getesteten Patienten gegen DGEBA-Epoxidharz sensibilisiert. Oft werden bei entsprechendem Verdacht von vornherein weitere Komponenten von Epoxidharzsystemen (über das DGEBA-Harz hinaus) epikutan getestet, so dass im IVDK auch Testergebnisse von Härtern bei Patienten ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz vorliegen. Allerdings werden Härter auch nicht bei jedem Patienten mit positiver Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (nach-)getestet. In den Jahren 2012 bis 2015 war dies im IVDK bei nur ca. 275 der 743 Patienten (ca. 37%) der Fall.

Die Testreaktionen auf die 4 Amin-Härter bei den Patienten mit nachgewiesener Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz sind in Tabelle 3.4.1.2 dargestellt.

Tabelle 3.4.1.2:
IVDK, 2012-2015, Patienten mit positiver Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (n=743):
Reaktionen auf Härter. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
m-Xylidendiamin (MXDA)	0,1 %	274	56	20,4%
Isophorondiamin (IPDA)	0,5 %	274	21	7,7%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	0,5 %	273	17	6,2%
Diethylentriamin (DETA)	1 %	273	7	2,6%

Durch die erwähnten „a priori-Testungen“ von Komponenten von Epoxidharzsystemen liegen im IVDK auch Daten zu Sensibilisierung gegen Härter bei ca. 5.000 Patienten ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz vor. Sie sind in Tabelle 3.4.1.3 wiedergegeben.

Tabelle 3.4.1.3:

IVDK, 2012-2015, Patienten mit negativer Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (n=41.704): Reaktionen auf Härter. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
m-Xylidendiamin (MXDA)	0,1 %	4.987	19	0,4%
Isophorondiamin (IPDA)	0,5 %	5.089	11	0,2%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	0,5 %	4.988	27	0,5%
Diethylentriamin (DETA)	1 %	5.026	32	0,6%

Um zu zeigen, wie häufig Sensibilisierungen gegen Amin-Härter mit Sensibilisierungen gegen DGEBA-Epoxidharz gekoppelt sind, und wie oft Sensibilisierungen gegen diese Härter „isoliert“, also ohne Epoxidharz-Allergie auftreten, ist in Tabelle 3.4.1.4 aufgeführt, wieviel Prozent der Patienten mit Sensibilisierung gegen einen der 4 Härter zusätzlich positiv auf DGEBA-Epoxidharz reagierten und wieviel Prozent keine Reaktion auf DGEBA-Harz aufwiesen. Die Patienten mit fraglichen Reaktionen auf das Harz blieben hier ausgeschlossen, weil unklar ist, ob es sich bei diesen Reaktionen um unspezifische Irritationen handelt oder möglicher Weise doch um schwach ausgeprägte Sensibilisierungen. Die Testzahlen weichen von denen in Tabelle 3.4.1.1 ab, weil hier nicht *alle* getesteten Patienten berücksichtigt wurden, sondern nur diejenigen, bei denen außer dem jeweiligen Härter auch das DGEBA-Epoxidharz getestet wurde.

Tabelle 3.4.1.4:

Patienten mit positiver Reaktion auf Härter unter den mit DGEBA-Epoxidharz getesteten Patienten (n=42.735): Reaktionen auf DGEBA-Epoxidharz.

Substanz [Testzahl]	Pat. mit positiver Reaktion	Davon positiv auf DGEBA-Harz		Davon negativ auf DGEBA-Harz	
m-Xylidendiamin (MXDA) [5.300]	78	56	72%	19	24%
Isophorondiamin (IPDA) [5.402]	33	21	64%	11	33%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA) [5.300]	47	17	36%	27	57%
Diethylentriamin (DETA) [5.337]	41	7	17%	32	78%

Auch in Bezug auf die 4 getesteten Amin-Härter weichen die Ergebnisse nicht signifikant von denen der Vorgängerstudie (FP-0324) ab.

Man kann festhalten, dass MXDA das häufigste Allergen unter den getesteten Härtern ist. Obwohl IPDA zumindest in Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe weiter verbreitet ist als MXDA, und positive Reaktionen auf IPDA nicht unbedingt (originäre) Sensibilisierungen durch den Kontakt mit IPDA anzeigen müssen, sondern auch Sensibilisierungen gegen Isophorondiisocyanat anzeigen können, ist die Sensibilisierungsquote niedriger. Dies kann auf ein im Vergleich zu MXDA niedrigeres Sensibilisierungspotential beim Einsatz von IPDA in Epoxidharzsystemen hindeuten.

Insgesamt waren Sensibilisierungen gegen die Amin-Härter bei den gegen DGEBA-Epoxidharz sensibilisierten Patienten erwartungsgemäß erheblich häufiger als bei den Patienten ohne Epoxidharz-Allergie. Der Anteil von Patienten mit Sensibilisierung gegen Amin-Härter ohne gleichzeitige Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz war deutlich höher als der entsprechende Anteil von Patienten unter denen mit Sensibilisierung gegen Reaktivverdünner. Dies gilt ganz besonders für TMHDA und DETA.

Auch hier decken sich die Daten weitgehend mit denen der Voruntersuchung. Alles dies unterstreicht, dass es sinnvoll ist, im Verdachtsfall Härter von Epoxidharzsystemen von vornherein mit zu testen.

3.4.2 Reaktionskopplungen

Aus der Vorgängerstudie ist bekannt, dass es auch zwischen MXDA und IPDA Reaktionskopplungen gibt, die allerdings sehr wahrscheinlich nicht auf immunologische Kreuzreaktionen zurückzuführen sind (dafür sind die chemischen Strukturen zu unterschiedlich). Vielmehr dürften in diesen Fällen gleichzeitige oder aufeinanderfolgende Expositionen gegenüber beiden Härtern in (unterschiedlichen) Epoxidharzsystemen die Ursache für die Reaktionskopplungen sein.

MXDA und IPDA wurden bei insgesamt 5.671 Patienten gleichzeitig epikutan getestet. 83 Patienten (1,5%) reagierten positiv auf MXDA, und 39 Patienten (0,7%) auf IPDA. 21 Patienten reagierten auf beide Härter, das sind 25% der Patienten mit positiver Reaktion auf MXDA bzw. 54% der Patienten mit positiver Reaktion auf IPDA. Die Reaktionskopplung lag damit im Bereich derjenigen, die auch in der Vorgängerstudie festgestellt worden war.

3.5. Sensibilisierungsmuster in definierten Subgruppen von Patienten

3.5.1 Maurer, Fliesenleger, Bauarbeiter usw.

Im Untersuchungszeitraum wurden 365 Maurer, Betonbauer, Fliesenleger, Bauarbeiter usw. (aktueller Beruf) im IVDK mit Epoxidharz auf Basis von DGEBA getestet. Eine Beschreibung dieser Gruppe mit dem MOAHLFA-Index findet sich in Tabelle 3.5.1.1.

Tabelle 3.5.1.1:

MOAHLFA-Index der 365 mit Epoxidharz getesteten Maurer, Fliesenleger, Bauarbeiter usw.

	Anzahl	Prozent
Männer	358	98,1
Berufsdermatose	187	51,2
Atopische Dermatitis	83	22,7
Handekzem	212	58,1
Beinekzem	17	4,7
Gesichtsekzem	37	10,1
Alter >= 40 Jahre	241	66,0

49 der 365 Getesteten (13,4%) reagierten positiv auf DGEBA-Epoxidharz (1% Vas.); davon hatten 37 (75,5%) eine Berufsdermatose, 22 (45%) ein Handekzem und 11 (22%) ein Gesichtsekzem. Bei 46 dieser Patienten wurden weitere Komponenten von Epoxidharzsystemen getestet (Ausnahme: Phenylglycidylether, n=47). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5.1.2 zusammengestellt.

Tabelle 3.5.1.2:

IVDK, 2012-2015, Maurer, Fliesenleger, Bauarbeiter usw. mit positiver Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (n=49): Reaktionen auf Reaktivverdünner und Härter. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	0,25 %	46	22	48%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	0,25 %	46	13	28%
Butylglycidylether (BGE)	0,25 %	46	3	7%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	0,25 %	46	3	7%
Phenylglycidylether (PGE)	0,25 %	47	15	32%
Cresylglycidylether (CGE)	0,25 %	46	7	15%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	0,25 %	46	13	28%
m-Xylidendiamin (MXDA)	0,1 %	46	21	46%
Isophorondiamin (IPDA)	0,5 %	46	7	15%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	0,5 %	46	5	11%
Diethylentriamin (DETA)	1 %	46	4	9%

Im Vergleich zum „Gesamtbestand“, also zu allen 743 Epoxidharz-positiven Patienten (siehe Tabellen 3.3.1.2 und 3.4.1.2) fällt auf, dass bei den Epoxidharz-positiven Maurern, Fliesenlegern, Bauarbeitern usw. Reaktionen auf MXDA, IPDA und TMHDA etwa doppelt so häufig, und auf DETA etwa dreimal so häufig beobachtet werden. Die Quote positive Reaktionen auf 1,4-BDDGE dagegen ist etwas verringert, während sich bei den weiteren Reaktivverdünnern keine Unterschiede ergeben.

Von den 365 getesteten Maurern, Fliesenlegern, Bauarbeitern usw. zeigten 310 (84,9%) keine Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (1% Vas.). Da zum Teil auch Komponenten von Epoxidharzsystemen bei entsprechendem klinischem Verdacht von vornherein getestet wurden, liegen auch Daten zur Sensibilisierung gegen Reaktivverdünner und Härter bei Patienten ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz vor. Sie sind in Tabelle 3.5.1.3 wiedergegeben.

Tabelle 3.5.1.3:

IVDK, 2012-2015, Maurer, Fliesenleger, Bauarbeiter usw. mit negativer Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (n=310): Reaktionen auf Reaktivverdünner und Härter. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	0,25 %	231	6	2,6%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	0,25 %	231	5	2,2%
Butylglycidylether (BGE)	0,25 %	230	3	1,3%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	0,25 %	231	1	0,4%
Phenylglycidylether (PGE)	0,25 %	235	3	1,3%
Cresylglycidylether (CGE)	0,25 %	232	1	0,4%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	0,25 %	231	0	0%
m-Xylidendiamin (MXDA)	0,1 %	231	5	2,2%
Isophorondiamin (IPDA)	0,5 %	233	4	1,7%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	0,5 %	231	4	1,7%
Diethylentriamin (DETA)	1 %	233	4	1,7%

Hier ergeben sich im Vergleich zu allen 41.704 Epoxidharz-Negativen allgemein leicht erhöhte Reaktionsquoten, insbesondere bei den Härtern und bei den beiden Reaktivverdünnern 1,6-HDDGE und 1,4-BDDGE.

3.5.2 Ingenieure, Mathematiker, Techniker, Architekten

Im Untersuchungszeitraum wurden 992 Ingenieure, Mathematiker, Techniker, Architekten usw. (aktuelle Berufsgruppe) im IVDK mit Epoxidharz auf Basis von DGEBA getestet. Eine Beschreibung dieser Gruppe mit dem MOAHLFA-Index findet sich in Tabelle 3.5.2.1.

Tabelle 3.5.2.1:
MOAHLFA-Index und aktuelle der 992 mit Epoxidharz getesteten Patienten der Berufsgruppe „Ingenieure, Mathematiker, Techniker, Architekten“.

	Anzahl	Prozent
Männer	767	77,3%
Berufsdermatose	194	19,6%
Atopische Dermatitis	261	26,3%
Handekzem	352	35,5%
Beinekzem	72	7,3%
Gesichtsekzem	175	17,6%
Alter >= 40 Jahre	640	64,5%

In dieser Berufsgruppe waren also im Vergleich zu den Maurern, Fliesenlegern, Bauarbeitern usw. weniger Patienten mit Berufsdermatose (19,6% vs. 51,2%) und weniger Handekzem-Patienten (35,5% vs. 58,1%), aber mehr Patienten mit Gesichtsekzem (17,6% vs. 10,1%).

36 der 992 Getesteten (3,6%) reagierten positiv auf DGEBA-Epoxidharz (1% Vas.), davon 18 (50%) mit Berufsdermatose, 14 (39%) mit Handekzem und 7 (19%) mit Gesichtsekzem. Unter den 36 Patienten mit Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz waren 11 Techniker (sonstige), 6 Ingenieure (sonstige), 3 Architekten und Bauingenieure, 3 Maschinenbautechniker, 2 Maschinenbauingenieure, 2 Elektrofachtechniker und 2 Bautechniker.

Bei 18 dieser Patienten wurden weitere Komponenten von Epoxidharzsystemen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5.2.2 zusammengestellt.

Tabelle 3.5.2.2:

IVDK, 2012-2015, Patienten der Berufsgruppe „Ingenieure, Mathematiker, Techniker, Architekten“ mit positiver Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (n=36): Reaktionen auf Reaktivverdünner und Härter. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	0,25 %	18	9	50%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	0,25 %	18	6	33%
Butylglycidylether (BGE)	0,25 %	18	1	6%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	0,25 %	18	0	0%
Phenylglycidylether (PGE)	0,25 %	18	4	22%
Cresylglycidylether (CGE)	0,25 %	18	2	11%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	0,25 %	18	4	22%
m-Xylidendiamin (MXDA)	0,1 %	18	2	11%
Isophorondiamin (IPDA)	0,5 %	18	0	0%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	0,5 %	18	3	17%
Diethylentriamin (DETA)	1 %	18	1	6%

Ein aussagekräftiger Vergleich mit dem „Gesamtbestand“, also mit allen 743 Epoxidharz-positiven Patienten (siehe Tabellen 3.3.1.2 und 3.4.1.2) ist aufgrund der geringen Stichprobengröße kaum möglich. Es fällt jedoch auf, dass keine Reaktionen auf IPDA und TMPTGE aufgetreten sind.

Von den 992 getesteten Patienten der Berufsgruppe „Ingenieure, Mathematiker, Techniker, Architekten“ zeigten 943 (95%) keine Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (1% Vas.). Da zum Teil auch Komponenten von Epoxidharzsystemen bei entsprechendem klinischem Verdacht von vornherein getestet wurden, liegen auch Daten zur Sensibilisierung gegen Reaktivverdünner und Härter bei Patienten ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz vor. Sie sind in Tabelle 3.5.2.3 wiedergegeben.

Tabelle 3.5.2.3:

IVDK, 2012-2015, Patienten der Berufsgruppe „Ingenieure, Mathematiker, Techniker, Architekten“ mit negativer Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (n=943): Reaktionen auf Reaktivverdünner und Härter. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	0,25 %	171	0	0%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	0,25 %	171	0	0%
Butylglycidylether (BGE)	0,25 %	171	0	0%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	0,25 %	171	0	0%
Phenylglycidylether (PGE)	0,25 %	233	1	0,4%
Cresylglycidylether (CGE)	0,25 %	171	1	0,6%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	0,25 %	171	0	0%
m-Xylidendiamin (MXDA)	0,1 %	171	0	0%
Isophorondiamin (IPDA)	0,5 %	171	0	0%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	0,5 %	171	2	1,2%
Diethylentriamin (DETA)	1 %	171	0	0%

In dieser Patientengruppe kamen also praktisch keine Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner oder Härter ohne begleitende Epoxidharz-Allergie vor.

3.5.3 Maler und Lackierer

Im Untersuchungszeitraum wurden 335 Maler und Lackierer (aktueller Beruf) im IVDK mit Epoxidharz auf Basis von DGEBA getestet. Eine Beschreibung dieser Gruppe mit dem MOAHLFA-Index findet sich in Tabelle 3.5.3.1.

Tabelle 3.5.3.1:
MOAHLFA-Index der 335 mit Epoxidharz getesteten Maler und Lackierer.

	Anzahl	Prozent
Männer	276	82,4%
Berufsdermatose	165	49,3%
Atopische Dermatitis	90	26,9%
Handekzem	174	51,9%
Beinekzem	14	4,2%
Gesichtsekzem	42	12,5%
Alter >= 40 Jahre	170	50,7%

27 der 335 Getesteten (8%) reagierten positiv auf DGEBA-Epoxidharz (1% Vas.), davon 24 (89%) mit Berufsdermatose, 16 (60%) mit Handekzem und 8 (30%) mit Gesichtsekzem. Bei 26 dieser Patienten wurden weitere Komponenten von Epoxidharzsystemen getestet (Ausnahmen: MXDA und PTBPGE, jeweils n=27). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5.3.2 zusammengestellt.

Tabelle 3.5.3.2:

IVDK, 2012-2015, Maler und Lackierer mit positiver Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (n=27):
Reaktionen auf Reaktivverdünner und Härter. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	0,25 %	26	15	58%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	0,25 %	26	12	46%
Butylglycidylether (BGE)	0,25 %	26	1	4%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	0,25 %	26	0	0%
Phenylglycidylether (PGE)	0,25 %	26	8	31%
Cresylglycidylether (CGE)	0,25 %	26	4	15%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	0,25 %	27	6	22%
m-Xylidendiamin (MXDA)	0,1 %	27	5	19%
Isophorondiamin (IPDA)	0,5 %	26	2	8%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	0,5 %	26	2	8%
Diethylentriamin (DETA)	1 %	26	0	0%

Im Vergleich zum „Gesamtbestand“, also zu allen 743 Epoxidharz-positiven Patienten (siehe Tabellen 3.3.1.2 und 3.4.1.2) ergeben sich keine auffälligen Unterschiede, wobei die geringe Stichprobengröße besonders zu berücksichtigen ist.

Von den 335 getesteten Malern und Lackierern zeigten 302 (90,1%) keine Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (1% Vas.). Da zum Teil auch Komponenten von Epoxidharzsystemen bei entsprechendem klinischen Verdacht von vornherein getestet wurden, liegen auch Daten zur Sensibilisierung gegen Reaktivverdünner und Härter bei Patienten ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz vor. Sie sind in Tabelle 3.5.3.3 wiedergegeben.

Tabelle 3.5.3.3:

IVDK, 2012-2015, Maler und Lackierer mit negativer Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (n=302): Reaktionen auf Reaktivverdünner und Härter. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	0,25 %	219	5	2,3%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	0,25 %	219	3	1,4%
Butylglycidylether (BGE)	0,25 %	219	2	0,9%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	0,25 %	219	2	0,9%
Phenylglycidylether (PGE)	0,25 %	229	2	0,9%
Cresylglycidylether (CGE)	0,25 %	220	0	0%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	0,25 %	219	0	0%
m-Xylidendiamin (MXDA)	0,1 %	219	3	1,4%
Isophorondiamin (IPDA)	0,5 %	221	4	1,8%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	0,5 %	219	3	1,4%
Diethylentriamin (DETA)	1 %	219	3	1,4%

Hier ergeben sich, ähnlich wie bei den Maurern etc. ohne Epoxidharz-Allergie im Vergleich zu allen 41.704 Epoxidharz-Negativen allgemein leicht erhöhte Reaktionsquoten, insbesondere bei den Härtern und bei den beiden Reaktivverdünnern 1,6-HDDGE und 1,4-BDDGE.

3.5.4 Kunststoffverarbeiter

Im Untersuchungszeitraum wurden 99 Kunststoffverarbeiter (aktueller Beruf) im IVDK mit Epoxidharz auf Basis von DGEBA getestet. Eine Beschreibung dieser Gruppe mit dem MOAHLFA-Index findet sich in Tabelle 3.5.4.1.

Tabelle 3.5.4.1:
MOAHLFA-Index der 335 mit Epoxidharz getesteten Kunststoffverarbeiter.

	Anzahl	Prozent
Männer	71	71,7%
Berufsdermatose	54	54,5%
Atopische Dermatitis	14	14,1%
Handekzem	50	50,5%
Beinekzem	5	5,1%
Gesichtsekzem	14	14,1%
Alter >= 40 Jahre	64	64,6%

21 der 99 Getesteten (21%) reagierten positiv auf DGEBA-Epoxidharz (1% Vas.). Alle diese Patienten hatten eine Berufsdermatose, 10 (48%) hatten ein Handekzem und 3 (14%) ein Gesichtsekzem. Bei allen 21 Patienten wurden weitere Komponenten von Epoxidharzsystemen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5.4.2 zusammengestellt.

Tabelle 3.5.4.2:

IVDK, 2012-2015, Kunststoffverarbeiter mit positiver Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (n=21): Reaktionen auf Reaktivverdünner und Härter. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	0,25 %	21	12	57%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	0,25 %	21	11	52%
Butylglycidylether (BGE)	0,25 %	21	4	19%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	0,25 %	21	2	10%
Phenylglycidylether (PGE)	0,25 %	21	7	33%
Cresylglycidylether (CGE)	0,25 %	21	5	24%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	0,25 %	21	7	33%
m-Xylidendiamin (MXDA)	0,1 %	21	2	10%
Isophorondiamin (IPDA)	0,5 %	21	0	0%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	0,5 %	21	0	0%
Diethylentriamin (DETA)	1 %	21	1	5%

Im Vergleich zum „Gesamtbestand“, also zu allen 743 Epoxidharz-positiven Patienten (siehe Tabellen 3.3.1.2 und 3.4.1.2) ergeben sich keine auffälligen Unterschiede bzgl. der Reaktionshäufigkeiten bei den Reaktivverdünnern. Reaktionen auf die Härter sind seltener, was man aber unter Berücksichtigung der geringen Stichprobengröße nicht überinterpretieren darf.

Von den 99 getesteten Kunststoffverarbeitern zeigten 75 (76%) keine Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (1% Vas.). Bei 54 dieser Patienten wurden weitere Komponenten von Epoxidharzsystemen getestet. Dabei ergaben sich keine positiven Reaktionen auf die hier untersuchten Reaktivverdünner und Härter.

3.5.5 Zusammenfassung

Die Subgruppen von Epoxidharz-positiven Patienten mit bestimmten Berufen haben insgesamt relativ geringe Stichprobengrößen. Daher sind berufsspezifische Sensibilisierungsmuster nicht erkennbar.

Es fällt jedoch auf, dass bei den Epoxidharz-positiven Maurern, Fliesenlegern, Bauarbeitern usw. besonders häufig Sensibilisierungen gegen die vier untersuchten Amin-Härter MXDA, IPDA, TMHDA und DETA beobachtet werden.

In der Berufsgruppe „Ingenieure, Mathematiker, Techniker, Architekten“ waren beruflich bedingte Hauterkrankungen deutlich seltener als in den anderen untersuchten Berufsgruppen. Möglicher Weise spielen hier als außerberufliche Expositionen ein größere ursächliche Rolle, auch in Bezug auf eine Sensibilisierung gegen Epoxidharz.

Bemerkenswert ist ferner, dass in der Gruppe der Kunststoffverarbeiter im Gegensatz zu allen anderen Berufsgruppen keine Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner oder Härter ohne begleitende Epoxidharz-Sensibilisierung festgestellt wurde. Ob dieser Befund indikations- oder expositionsbedingt ist, bleibt jedoch unklar.

3.6. Sonderfall 4,4'-Diaminodiphenylmethan

4,4'-Diaminodiphenylmethan ist hepatotoxisch, kanzerogen und sensibilisierend, und wird daher schon seit Jahren praktisch nicht (mehr) als Härter in Epoxidharzsystemen verwendet. Positive Testreaktionen auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan sind allgemein vergleichsweise häufig; ihre klinische Relevanz bleibt oft unklar. Nur selten ist eine Exposition der betroffenen Patienten gegenüber 4,4'-Diaminodiphenylmethan nachweisbar.

Eine mögliche Ursache für eine entsprechende Sensibilisierung (und positive Testreaktion) ist eine Sensibilisierung durch die Exposition gegenüber Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat, z.B. in 2-Komponenten-Polyurethan-Produkten. Vereinfacht dargestellt, wird Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat auf oder in der Haut zunächst zu 4,4'-Diaminodiphenylmethan umgewandelt, so dass der entsprechend (durch die Exposition gegenüber Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat) sensibilisierte Patient im Epikutantest auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan allergisch reagiert [Frick-Engfeldt et al. 2007]. Daher wird die Epikutantestung mit 4,4'-Diaminodiphenylmethan auch zur Diagnostik von Typ IV-Sensibilisierungen gegen Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat empfohlen [Aalto-Korte et al. 2012].

4,4'-Diaminodiphenylmethan gehört außerdem im weiteren Sinne zu den in para-Stellung disubstituierten aromatischen Aminen, den so genannten „Para-Stoffen“. Bei Patienten mit Sensibilisierung gegen „Para-Stoffe“ sind immunologische Kreuzreaktionen häufig, so dass oft allergische Reaktionen auf mehrere derartige Verbindungen bei ein und demselben Patienten zu beobachten sind (so genannte „Paragruppen-Allergie“). Ein Teil der allergischen Reaktionen auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan ist also sehr wahrscheinlich auch durch eine solche „Paragruppen-Allergie“ bedingt. Diese Patienten haben sich primär gegen einen anderen „Para-Stoff“, z.B. p-Phenylendiamin oder p-Toluyldiamin in Haarfarben, sensibilisiert und reagieren dann auch allergisch auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan [Belloni Fortina et al. 2001, Uter et al. 2002].

Wegen dieser Besonderheiten wurden die im IVDK registrierten Sensibilisierungen gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan nicht mit den anderen Amin-Härtern zusammen, sondern separat untersucht.

4,4'-Diaminodiphenylmethan ist Bestandteil der DKG-Testreihen „Kunstharze / Kleber“, „Leder und Schuhe“, „aromatische p-Aminoverbindungen“ und „Bau-Hauptgewerbe“.

3.6.1 Reaktionshäufigkeiten und Begleitreaktionen

In Tabelle 3.6.1.1 sind die auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan 0,5% Vas. beobachteten Reaktionen zusammengefasst. Dabei wurden die Reaktionshäufigkeiten bei allen mit DGEBA-Epoxidharz Getesteten den Reaktionshäufigkeiten bei Patienten mit positiver und mit negativer Reaktion auf DGEBA-Harz gegenübergestellt.

Tabelle 3.6.1.1:

IVDK, 2012-2015, Reaktionen auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan 0,5% Vas. in drei Gruppen von Patienten.

Reaktion	Mit DGEBA-Epoxidharz Getestete (n gesamt = 42.735)		Gegen DGEBA-Epoxidharz Sensibilisierte (n gesamt = 743)		Patienten ohne Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (n gesamt = 41.704)	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
negativ	7.488	96,0	267	89,3	7.175	96,3
fraglich	75	1,0	5	1,7	68	0,9
follikulär	4	0,1	0	0,0	4	0,1
+	114	1,5	13	4,3	97	1,3
++	73	0,9	12	4,0	61	0,8
+++	21	0,3	1	0,3	20	0,3
irritativ	27	0,3	1	0,3	22	0,3
Summe	7.802	100,0	299	100,0	7.447	100,0

Die Quote positiver Reaktionen lag also insgesamt bei 2,7% (208 von 7.802 Patienten), bei den Epoxidharz-Positiven bei 8,7% (26 von 299) und bei den Epoxidharz-Negativen bei 2,4% (178 von 7.447). Der Unterschied zwischen den beiden letztgenannten Gruppen ist statistisch signifikant (χ^2 -Test; $p < 0,0001$).

Wie bereits einleitend erwähnt, ist die signifikante Häufung positiver Reaktionen auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan unter den Patienten mit Sensibilisierung gegen DGEBA-Epoxidharz kein Beweis dafür, dass die Sensibilisierung gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan auch durch eine Epoxidharz-Exposition erworben wurde. Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass dieselben Patienten zumindest zum Teil auch gegenüber 2-Komponenten-Polyurethan-Produkten, und damit gegenüber Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat exponiert waren. Eine (zuverlässige) Epikutantestzubereitung für Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat steht nicht zur Verfügung; daher können (mangels entsprechender Testungen) diesbezüglich keine Kreuzreaktionen analysiert werden.

Um die erwähnte Möglichkeit immunologischer Kreuzreaktionen im Rahmen der so genannten „Paragruppen-Allergie“ zu überprüfen, wurden die Begleitreaktionen der Patienten mit und ohne Sensibilisierung gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan miteinander verglichen. In Bezug auf die so genannten „Para-Stoffe“ ergibt sich bei einer solchen Datenanalyse die Einschränkung, dass keiner dieser Stoffe in der Standardreihe enthalten ist, und daher ausschließlich selektiv getestet wird. Es liegen also lediglich Ergebnisse selektiver Testungen von „Para-Stoffen“ an selektiv mit 4,4'-Diaminodiphenylmethan getesteten Patienten vor. Dennoch kann eine solche Gegenüberstellung zumindest einen Anhaltspunkt für die Häufigkeit entsprechender Kreuzreaktionen geben.

Tabelle 3.6.1.2:

Reaktionen auf so genannte „Para-Stoffe“ bei Patienten mit (n = 208) und ohne (n = 7.488) Sensibilisierung gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan

Testsubstanz	4,4'-Diaminodiphenylmethan-Positive (n = 208)		4,4'-Diaminodiphenylmethan-Negative (n = 7.488)	
	n	%	n	%
p-Phenylendiamin	41 / 83	49,4%	103 / 3.093	3,3%
Dispers Orange 3	38 / 63	60,3%	41 / 2.059	2,0%
p-Aminoazobenzol	36 / 60	60,0%	78 / 2.034	3,8%
p-Toluyldiamin	31 / 43	72,1%	57 / 639	8,9%
p-Aminophenol	23 / 45	51,1%	7 / 641	1,1%

Auch wenn aus den oben dargestellten Gründen keine exakte quantitative Aussage möglich ist, so wird dennoch deutlich, dass ein großer Teil der positiven Testreaktionen auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan als Teil einer so genannten „Paragruppen-Allergie“ zu interpretieren ist, und daher nicht primär auf eine Epoxidharz-Exposition zurückgeführt werden kann. Vielmehr sind Haarfarben, Henna-Tattoos usw. als relevante Allergenquelle für die Sensibilisierungen gegen „Para-Stoffe“ in Betracht zu ziehen.

Weitere Aufschlüsse über die mögliche Ursache der Sensibilisierungen gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan kann auch die vergleichende Betrachtung der Patientengruppen mit bzw. ohne entsprechende Sensibilisierung geben.

3.6.2 Klinische und anamnestische Daten der gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan sensibilisierten Patienten

In Tabelle 3.6.2.1 sind die beiden Patientenpopulationen mit und ohne Sensibilisierung gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan mit dem MOAHLFA-Index beschrieben.

Tabelle 3.6.2.1:

MOAHLFA-Index der Patienten mit positiver Reaktion (n=208) und der Patienten mit negativer Reaktion (n=7.488) auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan.

	4,4'-Diaminodiphenylmethan-Positive	4,4'-Diaminodiphenylmethan-Negative
Männer	51,9%	56,8%
Berufsdermatose	44,2%	29,0%
Atopische Dermatitis	20,7%	24,0%
Handekzem	40,4%	46,8%
Beineckzem	5,8%	7,4%
Gesichtsekzem	16,3%	9,1%
Alter >= 40 Jahre	57,2%	69,4%

Unter den Patienten mit Sensibilisierung gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan fallen vor allem ein erhöhter Anteil von Patienten mit Berufsdermatose und ein verringerter Anteil von Patienten ab 40 Jahren auf.

Die folgenden aktuellen Berufsgruppen finden sich bei den Patienten mit Sensibilisierung gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan gehäuft: „Maurer, Fliesenleger, Bauarbeiter usw.“ (12,0% vs. 3,5%), „Maler und Lackierer“ (6,7% vs. 3,3%) und „Tischler, Holzbearbeiter“ (3,8% vs. 1,8%).

Beim Vergleich der individuellen mutmaßlichen Allergenquellen fallen folgende Unterschiede auf: Unter den Patienten mit positiver Reaktion auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan finden sich häufiger die Angaben „Kleber“ (20,7% vs. 10,4%), „Baustoffe“ (14,9% vs. 7,8%), „Farben, Lacke“ (12,5% vs. 5,3%) und „Friseurstoffe“ (12,5% vs. 2,3%).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten:

4,4'-Diaminodiphenylmethan wird praktisch nicht mehr in Epoxidharzsystemen eingesetzt. Das Spektrum der mutmaßlichen Allergenquellen, weiterer Patientencharakteristika und der Begleitsensibilisierungen legt den Schluss nahe, dass Sensibilisierungen gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan überwiegend nicht durch die Exposition gegenüber dieser Verbindung erworben wurden, sondern hauptsächlich Ausdruck primärer Sensibilisierungen gegen Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat oder gegen so genannte „Para-Stoffe“ sind. Altsensibilisierungen durch frühere Exposition gegenüber 4,4'-Diaminodiphenylmethan sind allerdings nicht ausgeschlossen.

4. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Im Rahmen des Teilprojektes I des Informationsverbundes Dermatologischer Kliniken (IVDK) wurden Daten des IVDK der Jahre 2012 bis 2015 ausgewertet. In diesen 4 Jahren wurden in den 56 am IVDK beteiligten dermatologischen Abteilungen insgesamt 50.102 Patienten epikutan getestet. Ein Epoxidharz auf Basis von Bisphenol A-diglycidylether (DGEBA) wurde im Rahmen der Standardreihe bei 85% der Patienten getestet. Es handelte sich also nicht um gezielte Epikutantestungen bei Patienten mit konkretem Verdacht auf eine Epoxidharz-Allergie. Insgesamt wurde das DGEBA-Harz (1% Vas.) bei 42.735 Patienten getestet, von denen 743 (1,74%) positiv reagierten. Unter den Patienten mit allergischer Reaktion auf das DGEBA-Epoxidharz waren gehäuft Männer und Patienten mit Berufsdermatose; die Berufe Maler und Lackierer, Laminierer, Maurer, Bauhilfsarbeiter, Fußbodenleger, Techniker und Kunststoffverarbeiter waren vermehrt betroffen. Damit übereinstimmend wurden die Kategorien Kleber, Kunststoffe, Baustoffe, Farben und Lacke vermehrt als mutmaßliche Ursache des Ekzems bzw. als Allergenquelle angegeben.

Die folgenden weiteren Komponenten von Epoxidharzsystemen wurden gezielt bei Patienten mit Verdacht auf Epoxidharz-Allergie oder bei Patienten mit positiver Reaktion auf das DGEBA-Epoxidharz getestet (siehe Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1:

Weitere, bei Verdacht auf Epoxidharz-Allergie epikutan getestete Komponenten von Epoxidharzsystemen. Alle Testzubereitungen in Vaseline.

Substanz	CAS Nr.	Test- konzentration
Reaktivverdünner		
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	16096-31-4	0,25 %
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	2425-79-8	0,25 %
Butylglycidylether (BGE)	2426-08-6	0,25 %
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	30499-70-8	0,25 %
Phenylglycidylether (PGE)	122-60-1	0,25 %
Cresylglycidylether (CGE)	26447-14-3	0,25 %
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	3101-60-8	0,25 %
Härter		
m-Xylidendiamin (MXDA)	1477-55-0	0,1 %
Isophorondiamin (IPDA)	2855-13-2	0,5 %
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	25620-58-0	0,5 %
Diethylentriamin (DETA)	111-40-0	1 %
4,4'-Diaminodiphenylmethan	101-77-9	0,5 %

Die Testergebnisse bei Patienten mit *positiver* Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 4.2) wiedergegeben.

Tabelle 4.2.:

Patienten mit positiver Reaktion auf Epoxidharz auf Basis von DGEBA, 1 % Vas. (n=743):
Testungen mit und Reaktionen auf weitere Bestandteile von Epoxidharzsystemen. Alle
Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	0,25 %	273	133	48,7%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	0,25 %	272	96	35,3%
Butylglycidylether (BGE)	0,25 %	274	25	9,1%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	0,25 %	273	20	7,3%
Phenylglycidylether (PGE)	0,25 %	297	90	30,3%
Cresylglycidylether (CGE)	0,25 %	274	43	15,7%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	0,25 %	274	73	26,6%
m-Xylidendiamin (MXDA)	0,1 %	274	56	20,4%
Isophorondiamin (IPDA)	0,5 %	274	21	7,7%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	0,5 %	273	17	6,2%
Diethylentriamin (DETA)	1 %	273	7	2,6%

Bei der Analyse der Testreaktionen auf die einzelnen Reaktivverdünner und Amin-Härter fiel auf, dass 18% bis 28% der allergischen Reaktionen auf Reaktivverdünner und sogar 24% bis 78% der Reaktionen auf Amin-Härter bei Patienten auftraten, die *nicht* gegen das DGEBA-Epoxidharz sensibilisiert waren.

Da eine Exposition gegenüber diesen Verbindungen außerhalb von Epoxidharzsystemen selten und daher relativ unwahrscheinlich ist, erscheinen auch die Sensibilisierungen gegen Amin-Härter und Reaktivverdünner, die unabhängig von einer Sensibilisierung gegen das DGEBA-Epoxidharz auftreten, für die übergeordnete Fragestellung des Forschungsvorhabens von Bedeutung.

Im Fall des Isophorondiamin ist allerdings zu berücksichtigen, dass Sensibilisierungen auch durch die Exposition gegenüber Isophorondiisocyanat erworben werden können. Vereinfacht dargestellt, wird Isophorondiisocyanat auf oder in der Haut zu Isophorondiamin umgewandelt, so dass der entsprechend (durch die Exposition gegenüber Isophorondiisocyanat) sensibilisierte Patient im Epikutantest auf Isophorondiamin allergisch reagiert [Aalto-Korte et al. 2012, Frick-Engfeldt et al. 2007]. Mit anderen Worten: Die Häufigkeit der Sensibilisierungen gegen Isophorondiamin durch die Exposition in Epoxidharzsystemen kann möglicherweise bei unserer Datenanalyse überschätzt worden sein.

In Tabelle 4.3 sind die Testergebnisse mit Amin-Härtern und Reaktivverdünnern bei Patienten mit *negativer* Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz wiedergegeben.

Um das Bild zu vervollständigen, sind in der danach folgenden Tabelle (Tabelle 4.4) die bei *allen mit dem DGEBA-Epoxidharz getesteten Patienten* beobachteten Testreaktionen auf die Amin-Härter und Reaktivverdünner zusammengestellt, unabhängig von der Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz.

Tabelle 4.3:

Patienten mit negativer Reaktion auf DGEBA-Epoxidharz (n=41.704):

Testungen mit und Reaktionen auf weitere Bestandteile von Epoxidharzsystemen. Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	0,25 %	4.990	30	0,6%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	0,25 %	4.989	31	0,6%
Butylglycidylether (BGE)	0,25 %	4.991	10	0,2%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	0,25 %	4.985	5	0,1%
Phenylglycidylether (PGE)	0,25 %	7.044	21	0,3%
Cresylglycidylether (CGE)	0,25 %	5.061	11	0,2%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	0,25 %	4.988	2	0,0%
m-Xylidendiamin (MXDA)	0,1 %	4.987	19	0,4%
Isophorondiamin (IPDA)	0,5 %	5.089	11	0,2%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	0,5 %	4.988	27	0,5%
Diethylentriamin (DETA)	1 %	5.026	32	0,6%

Tabelle 4.4:

Mit DGEBA-Epoxidharz getestete Patienten (n=42.735):

Testungen mit und Reaktionen auf weitere Bestandteile von Epoxidharzsystemen.

Alle Testsubstanzen in Vaseline.

Substanz	Konz.	Anzahl Getestete	Anzahl Positive	% positiv
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	0,25 %	5.686	180	3,2%
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	0,25 %	5.684	142	2,5%
Butylglycidylether (BGE)	0,25 %	5.686	42	0,7%
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	0,25 %	5.691	27	0,5%
Phenylglycidylether (PGE)	0,25 %	7.916	121	1,5%
Cresylglycidylether (CGE)	0,25 %	5.763	60	1,0%
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	0,25 %	5.689	83	1,5%
m-Xylidendiamin (MXDA)	0,1 %	5.694	84	1,5%
Isophorondiamin (IPDA)	0,5 %	5.791	41	0,7%
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomerengemisch; TMHDA)	0,5 %	5.690	42	0,9%
Diethylentriamin (DETA)	1 %	5.730	47	0,8%

Allergische Reaktionen auf einen bestimmten Stoff sind zwar in der Regel Ausdruck einer Sensibilisierung gegen diesen Stoff durch Exposition gegenüber genau diesem Stoff. Sie können aber auch dadurch zustande kommen, dass sich der Betroffene gegen einen anderen, chemisch verwandten Stoff sensibilisiert hat, und nun nicht nur auf sein primäres Allergen, sondern auch auf weitere chemisch verwandte Stoffe allergisch reagiert. Dieses Phänomen nennt man immunologische Kreuzreaktion.

Zwischen dem Epoxidharz auf Basis von DGEBA und dem Phenylglycidylether sind immunologische Kreuzreaktionen bekannt; daher treten allergische Reaktionen auf Phenylglycidylether auch bei Patienten auf, die sehr wahrscheinlich nicht gegenüber diesem Reaktivverdünner exponiert waren. Zwischen den drei aromatischen Glycidylethern Phenylglycidylether, Cresylglycidylether und p-tert-Butylphenylglycidylether gibt es ebenfalls immunologische Kreuzreaktionen, ebenso zwischen den beiden aliphatischen Glycidylethern

1,6-Hexandioldiglycidylether und 1,4-Butandioldiglycidylether. Möglicher Weise bestehen auch Kreuzreaktionen zwischen 1,4-Butandioldiglycidylether und Butylglycidylether.

Auch die Testergebnisse mit 4,4'-Diaminodiphenylmethan, das in der Liste der zu bearbeitenden Substanzen des Gesamtprojektes FP-0324 enthalten ist, wurden ausgewertet. Diese aromatische Verbindung nimmt jedoch eine Sonderstellung ein.

4,4'-Diaminodiphenylmethan wird wegen seiner Toxizität praktisch nicht (mehr) als Härter in Epoxidharzsystemen verwendet. Dennoch werden Sensibilisierungen gegen diese Substanz relativ häufig beobachtet. Eine mögliche Ursache dafür ist eine Sensibilisierung durch die Exposition gegenüber Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat, z.B. in 2-Komponenten-Polyurethan-Produkten. Vereinfacht dargestellt, wird Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat auf oder in der Haut zu 4,4'-Diaminodiphenylmethan umgewandelt; daher kann ein gegenüber Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat Exponierter sich gegen Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat und / oder 4,4'-Diaminodiphenylmethan sensibilisieren, so dass er im Epikutantest (auch) auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan allergisch reagiert. Daher wird die Epikutantestung mit 4,4'-Diaminodiphenylmethan auch zur Diagnostik von Typ IV-Sensibilisierungen gegen Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat empfohlen.

4,4'-Diaminodiphenylmethan gehört außerdem im weiteren Sinne zu den in para-Stellung disubstituierten aromatischen Aminen, den so genannten „Para-Stoffen“. Bei Patienten mit Sensibilisierung gegen „Para-Stoffe“ sind immunologische Kreuzreaktionen häufig, so dass oft allergische Reaktionen auf mehrere derartige Verbindungen bei ein und demselben Patienten zu beobachten sind (so genannte „Paragruppen-Allergie“). Ein Teil der allergischen Reaktionen auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan ist also sehr wahrscheinlich auch durch eine solche „Paragruppen-Allergie“ bedingt. Diese Patienten haben sich primär gegen einen anderen „Para-Stoff“, z.B. p-Phenylendiamin oder p-Toluylendiamin in Haarfarben, sensibilisiert und reagieren dann auch allergisch auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan.

Auch in unseren Daten legte das Spektrum der mutmaßlichen Allergenquellen, weiterer Patientencharakteristika und der Begleitsensibilisierungen den Schluss nahe, dass die Sensibilisierungen gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan nicht originär durch die Exposition gegenüber dieser Verbindung erworben wurden, sondern hauptsächlich Ausdruck primärer Sensibilisierungen gegen Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat oder gegen so genannte „Para-Stoffe“ sind. Zwar sind Altsensibilisierungen durch frühere Exposition gegenüber 4,4'-Diaminodiphenylmethan nicht ausgeschlossen, die Daten tragen jedoch nicht (wesentlich) zum übergeordneten Ziel des Forschungsvorhabens bei.

Insgesamt konnten die Erkenntnisse aus dem Teilprojekt 5.4.1 des IVDK des Vorgängerprojektes FP-0324 qualitativ und quantitativ bestätigt werden.

5. Allergologische Bewertung der epikutan getesteten Komponenten von Epoxidharzsystemen an Hand der vorliegenden Daten

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten aus dieser Datenauswertung gewonnenen Erkenntnisse über die in Tabelle 2.1 genannten Substanzen stichwortartig verkürzt zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 5.1:

Zusammenfassende Darstellung der wichtigsten Ergebnisse zu den einzelnen untersuchten Epoxidharz-Komponenten.

Substanz	Kommentar
Harze	
Bisphenol A-Epoxidharz (DGEBA-Harz)*	nach wie vor häufigstes und wichtigstes Allergen in diesem Bereich
Reaktivverdünner	
1,6-Hexandioldiglycidylether (1,6-HDDGE)	häufigstes Allergen unter den Reaktivverdünnern; immunologische Kreuzreaktionen mit 1,4-BDDGE
1,4-Butandioldiglycidylether (1,4-BDDGE)	zweithäufigstes Allergen unter den Reaktivverdünnern, wahrscheinlich oft durch immunologische Kreuzreaktionen bei primärer Sensibilisierung gegen 1,6-HDDGE
Butylglycidylether (BGE)	deutlich selteneres Allergen unter den Reaktivverdünnern; möglicher Weise immunologische Kreuzreaktionen (via Metabolisierung) bei primärer Sensibilisierung gegen 1,4-BDDGE
Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)	seltenstes Allergen unter den Reaktivverdünnern
Phenylglycidylether (PGE)	aktuell fast nicht verbreitet in Epoxidharzsystemen; dennoch sehr häufiges Allergen unter den Reaktivverdünnern, wohl durch immunologische Kreuzreaktionen bei primärer Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz
Cresylglycidylether (CGE)**	selten isolierte Sensibilisierungen; Sensibilisierungen wohl vor allem durch immunologische Kreuzreaktionen
p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	häufiges Allergen unter den Reaktivverdünnern, wahrscheinlich zum Teil als eigenständiges Allergen, zum Teil aber auch durch immunologische Kreuzreaktionen

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 5.1 (Fortsetzung):

Zusammenfassende Darstellung der wichtigsten Ergebnisse zu den einzelnen untersuchten Epoxidharz-Komponenten.

Substanz	Kommentar
Härter	
m-Xylidendiamin (MXDA)	mit Abstand häufigstes Allergen unter den Amin-Härtern
Isophorondiamin (IPDA)	zweithäufigstes Allergen unter den Amin-Härtern; Reaktionen auf IPDA können jedoch auch Sensibilisierungen gegen Isophorondiisocyanat anzeigen
Trimethylhexan-1,6-diamin (Isomergemisch; TMHDA)	mäßig häufiges Allergen unter den Amin-Härtern; häufig Sensibilisierungen ohne gleichzeitige Sensibilisierung gegen Epoxidharz
Diethylentriamin (DETA)	kaum verbreitet in Epoxidharzsystemen; selteneres Allergen unter den Amin-Härtern; häufig Sensibilisierungen ohne gleichzeitige Sensibilisierung gegen Epoxidharz
4,4'-Diaminodiphenylmethan	wird nicht mehr in Epoxidharzsystemen verwendet; Sensibilisierung wahrscheinlich meist bedingt durch immunologische Kreuzreaktionen bei primärer Sensibilisierung gegen Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat oder in para-Stellung disubstituierte aromatisch Amine

* CAS-Nummern 25068-38-6 und 25085-99-8 zusammengefasst.

** CAS Nummern 2210-79-9 und 26447-14-3 zusammengefasst.

6. Literatur

- Aalto-Korte K, Suuronen K, Kuuliala O, Henriks-Eckerman M-L, Jolanki R. Occupational contact allergy to monomeric isocyanates. *Contact Dermatitis* 2012; 67: 78-88
- Belloni Fortina A, Piaserico S, Larese F, Recchia GP, Corradin MT, Gennaro F, Carrabba E, Peserico A. Diaminodiphenylmethane (DDM): frequency of sensitization, clinical relevance and concomitant positive reactions. *Contact Dermatitis* 2001; 44: 283-288
- Frick-Engfeldt M, Isaksson M, Zimerson E, Bruze M. How to optimize patch testing with diphenylmethane diisocyanate. *Contact Dermatitis* 2007; 57: 138-151
- Geier J, Uter W, Lessmann H, Schnuch A. The positivity ratio – another parameter to assess the diagnostic quality of a patch test preparation. *Contact Dermatitis* 2003; 48: 280-282
- Geier J, Weisshaar E, Lessmann H, Becker D, Dickel H, Häberle M, John SM, Mahler V, Skudlik C, Wagner E, Wehrmann W, Werfel T, Zagrodnik F, Diepgen TL für die Arbeitsgruppe „Bewertung der Allergene bei BK 5101“ der Arbeitsgemeinschaft für Berufs- und Umweltdermatologie in der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft: Bewertung von Epikutantestreaktionen auf "Problemallergene" mit vermehrt fraglichen oder schwach positiven Reaktionen. *Dermatologie in Beruf und Umwelt* 2010; 58: 34-38
- Pontén A, Zimerson E, Bruze M. Sensitizing capacity and cross-reactivity of phenyl glycidyl ether. *Contact Dermatitis* 2004; 50: 166
- Schnuch A, Aberer W, Agathos M, Becker D, Brasch J, Elsner P, Frosch PJ, Fuchs Th, Geier J, Hillen U, Löffler H, Mahler V, Richter G, Szliska C für die Deutsche Kontaktallergie-Gruppe. Durchführung des Epikutantests mit Kontaktallergenen. Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Allergie und klinische Immunologie (DGAKI). *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 2008 a; 6: 770-775
- Schnuch A, Geier J, Lessmann H, Arnold R, Uter W. Surveillance of contact allergies: methods and results of the Information Network of Departments of Dermatology (IVDK). *Allergy* 2012; 67: 847-857
- Schnuch A, Geier J, Uter W, Frosch PJ et al. National rates and regional differences in sensitization to allergens of the standard series. Population-adjusted frequencies of sensitization (PAFS) in 40,000 patients from a multicenter study (IVDK). *Contact Dermatitis* 1997; 37: 200-209
- Schnuch A, Uter W, Lessmann H, Arnold R, Geier J. Klinische Epidemiologie der Kontaktallergien. Das Register und das Überwachungssystem des Informationsverbundes Dermatologischer Kliniken (IVDK). *Allergo Journal* 2008 b; 17: 611-624
- Uter W, Lessmann H, Geier J, Becker D, Fuchs Th, Richter G. The spectrum of allergic (cross-)sensitivity in clinical patch testing with 'para amino' compounds. *Allergy* 2002; 57: 319-322
- Uter W, Mackiewicz M, Schnuch A, Geier J. Interne Qualitätssicherung von Epikutantest-Daten des multizentrischen Projektes „Informationsverbund Dermatologischer Kliniken“ (IVDK). *Dermatologie in Beruf und Umwelt* 2005; 53: 107-114

**ANHANG 2 – ZUSÄTZLICHE HUMANDATEN – LITERATURSTUDIE ÜBER
ALLERGOLOGISCHE HUMANBEFUNDE ZU INHALTSSTOFFEN VON
EPOXIDHARZSYSTEMEN**

Forschungsvorhaben

**„Vergleichende gesundheitliche Bewertung von Epoxidharzsystemen
unter Berücksichtigung sensibilisierender Wirkstärke“**

gefördert aus Mitteln des Forschungsfonds der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung

Kennziffer FP-0384

Teilprojekt II

des Informationsverbundes Dermatologischer Kliniken (IVDK)

**„Zusätzliche Humandaten –
Literaturstudie über allergologische Humanbefunde
zu Inhaltsstoffen von Epoxidharzsystemen“**

Prof. Dr. med. Johannes Geier
Dr. rer. nat. Holger Lessmann
Informationsverbund Dermatologischer Kliniken (IVDK)
Institut an der Universitätsmedizin Göttingen
Von-Bar-Str. 2-4
37075 Göttingen
Tel. 0551 505 39 625
e-mail: jgeier@gwdg.de
<http://www.ivdk.org>



Inhaltsverzeichnis

			Seite
0	Verzeichnis der Abkürzungen		5
1	Hintergrund und verwendete Quellen		6
2	Beschreibung der verwendeten Methoden		7
3	Stoffdatenanalyse		9
3.1	Epoxidharze		9
3.1.1	Bisphenol A-Harze	CAS 025068-38-6	9
3.1.2	Reaktionsprodukt Bisphenol A Epichlorhydrin	CAS 025085-99-8	15
3.1.3	Bisphenol-A-Epichlorhydrin MW 340	CAS 001675-54-3	16
3.1.4	Bisphenol F-Harze	CAS 009003-36-5	17
3.1.5	Bisphenol-F-Epichlorhydrin	CAS 028064-14-4	19
3.1.6	Epoxidharz-Monomere aus O'Boyle et al. 2012 und 2014	CAS 013410-58-7 CAS 003530-44-7	20
3.2	Härter, aromatische Amine		21
3.2.1	4,4'-Diaminodiphenylmethan	CAS 000101-77-9	21
3.3	Härter, aliphatische Amine		24
3.3.1	Ethylendiamin	CAS 000107-15-3	24
3.3.2	Diethylentriamin	CAS 000111-40-0	26
3.3.3	Dipropylentriamin	CAS 000056-18-8	28
3.3.4	Trimethylhexamethylendiamin	CAS 025620-58-0	29
3.3.5	Triethylentetramin	CAS 000112-24-3	31
3.3.6	N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan	CAS 000109-55-7	33
3.3.7	Tetraethylenpentamin	CAS 000112-57-2	35
3.3.8	Pentaethylenhexamin	CAS 004067-16-7	36
3.3.9	Polyethylenpolyamin	CAS 068131-73-7	37
3.3.10	Polyethylenamine	CAS 026336-38-9	38
3.3.11	N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin	CAS 002372-82-9	39
3.3.12	2,2,4-Trimethylhexan-1,6-diamin	CAS 025513-64-8	40
3.4	Härter, cycloaliphatische Amine		41
3.4.1	4,4'-Diaminocyclohexylmethan	CAS 001761-71-3	41
3.4.2	Bis(4-(1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethylamino)-3-methylcyclohexyl)methan	CAS 136210-32-7	42
3.4.3	N-Aminoethylpiperazin	CAS 000140-31-8	43

3.4.4	Isophorondiamin	CAS 002855-13-2	44
3.4.5	3-Cyclohexylaminopropylamin	CAS 003312-60-5	46
3.4.6	1,2-Diaminocyclohexan	CAS 000694-83-7	47
3.4.7	1,3-Cyclohexylen-bis(methylamin)	CAS 002579-20-6	48
3.5	Härter, sonstige		49
3.5.1	m-Xylidendiamin	CAS 001477-55-0	49
3.5.2	m-Xylylendiamin/Acrylnitril Adduct	CAS 073050-11-0	51
3.5.3	N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan	CAS 001760-24-3	52
3.5.4	Polyoxyalkylenamin	CAS 002997-01-5	53
3.5.5	3-Aminopropyltriethoxysilan	CAS 000919-30-2	54
3.5.6	Oligomerisierter Härter: 4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin	CAS 038294-64-3	55
3.5.7	Formaldehyd, Polymer mit Benzenamin, hydriert	CAS 135108-88-2	56
3.5.8	Polyethylenpoly-, triethylentetramin	CAS 090640-46-3	57
3.6	Dicarbonsäureanhydride		58
3.6.1	Phthalsäureanhydrid	CAS 000085-44-9	58
3.6.2	Tetrahydrophthalsäureanhydrid	CAS 000085-43-8	59
3.6.3	Hexahydrophthalsäureanhydrid	CAS 000085-42-7	60
3.6.4	Methyltetrahydrophthalsäureanhydrid	CAS 011070-44-3	61
3.6.5	Methylhexahydrophthalsäureanhydrid	CAS 025550-51-0	62
3.7	Sekundäre und tertiäre Amine		63
3.7.1	3-((6-Aminotrimethylhexyl)amino)propionitril	CAS 093941-62-9	63
3.7.2	N,N-Dimethyl-cyclohexanamin	CAS 000098-94-2	64
3.8	Phenole		65
3.8.1	p-tert-Butylphenol	CAS 000098-54-4	65
3.8.2	Bisphenol A	CAS 000080-05-7	66
3.8.3	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	CAS 000090-72-2	67
3.8.4	Bis[(dimethylamino)methyl]phenol	CAS 071074-89-0	69
3.9	Reaktivverdünner		70
3.9.1	Butylglycidylether	CAS 002426-08-6	70
3.9.2	1,4-Butandiol diglycidylether	CAS 002425-79-8	72
3.9.3	Neopentylglykol-diglycidylether	CAS 017557-23-2	74
3.9.4	2-Ethylhexylglycidylether	CAS 002461-15-6	76

3.9.5	1,6-Hexandioldiglycidylether	CAS 016096-31-4	77
3.9.6	Versaticsäureglycidylester (z.B. Cadura E 10) 2,2'-Dioctyldecansäure-2,3 epoxypropylester	CAS 026761-45-5	79
3.9.7	Trimethylolpropan-triglycidylether	CAS 030499-70-8	81
3.9.8	C12/C14-Monoglycidylether	CAS 068609-97-2	83
3.9.9	Polypropylenglykoldiglycidylether / Polyoxypropylen- diglycidylether	CAS 026142-30-3	85
3.9.10	Polypropylenglykol (chlormethyl)oxiran Polymer	CAS 009072-62-2	86
3.9.11	Dipropylenglykol-diglycidylether	CAS 041638-13-5	87
3.9.12	Cyclohexandimethanol-diglycidylether Cyclohexandimethanol-divinylether	CAS 014228-73-0 CAS 017351-75-6	88
3.9.13	p-tert-Butylphenylglycidylether	CAS 003101-60-8	89
3.9.14	Phenylglycidylether	CAS 000122-60-1	91
3.9.15	o-Kresylglycidylether	CAS 002210-79-9	93
3.9.16	Kresylglycidylether, Isomerengemisch	CAS 026447-14-3	94
3.9.17	Propantriolglycidylether 1,2,3-Propantriol, Polymer mit 2-(Chlormethyl)oxiran	CAS 090529-77-4 CAS 025038-04-4	96
3.9.18	7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7- oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat	CAS 002386-87-0	97
3.9.19	4,4'-Methylenbis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)anilin]	CAS 028768-32-3	99
4.	Diskussion und Schlussfolgerung		101
5.	Literatur		110

Verzeichnis der Abkürzungen

CAS	Chemical Abstracts Service
DGEBA	Diglycidylether of Bisphenol A, (= Bisphenol A-diglycidylether)
DGEBF	Diglycidylether of Bisphenol F, (= Bisphenol F-diglycidylether)
ECHA	European Chemicals Agency
FIOH	Finnish Institute of Occupational Health
GISBAU	Gefahrstoff-Informations-System der Berufsgenossenschaften der Bauwirtschaft
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IVDK	Informationsverbund Dermatologischer Kliniken
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
OR	Odds Ratio
PVC	Polyvinylchlorid
ROAT	Repeated Open Application Test
Vas.	Vaseline; in Vaseline

1. Hintergrund und verwendete Quellen

Das Forschungsvorhaben FP-0384 hat – wie das Vorgängerprojekt FP-0324 – zum Ziel, Inhaltsstoffe von Epoxidharzsystemen nach ihrer jeweiligen sensibilisierenden Wirkstärke zu differenzieren und, soweit möglich, zu klassifizieren. Primär werden dazu wissenschaftliche Veröffentlichungen zur Sensibilisierung auf der Basis von Tierversuchen, in vitro-Untersuchungen oder in silico-Methoden (Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen) sowie die Ergebnisse entsprechender im Rahmen dieses Projektes originär durchgeführter Untersuchungen ausgewertet.

In dem hier vorliegenden Teilprojekt des Informationsverbundes Dermatologischer Kliniken (IVDK) sollen zusätzlich publizierte Humandaten zur Sensibilisierung ausgewertet werden. Dabei liegt der Schwerpunkt nicht bei experimentellen Studien, sondern bei Untersuchungen über sensibilisierte Erkrankte. Im Vordergrund stehen dabei selbstverständlich Veröffentlichungen über Menschen, die sich durch den Kontakt mit einem entsprechenden Epoxidharz-Produkt gegen einen oder mehrere Inhaltsstoffe des betreffenden Epoxidharzsystems sensibilisiert haben. Darüber hinaus werden aber auch Publikationen herangezogen, in denen Testergebnisse von seriellen, also weniger gezielten, Testungen mit den entsprechenden Allergenen vorgestellt werden. Schließlich werden auch Publikationen berücksichtigt, in denen Sensibilisierungen gegen die betreffenden Stoffe durch andere Expositionen als den Kontakt mit Epoxidharzsystemen erworben wurden. Auch Publikationen über allergologische Kreuzreaktionen oder Reaktionskopplungen sind in die Literaturoauswertung eingeflossen. Die berücksichtigten Veröffentlichungen sind im Wesentlichen klinisch-epidemiologische Untersuchungen, Epikutantest-Studien und Einzelfallberichte bzw. Berichte über kleinere Fall-Serien.

Diese Humandaten können darüber Auskunft geben, welche Bestandteile von Epoxidharzsystemen bereits wie häufig als Allergene im (Berufs-)Alltag aufgefallen sind, und welche Expositionen bei der Sensibilisierung eine Rolle spielen.

Die Humandaten sind insofern von besonderer Bedeutung, als Tierversuche oder in-vitro-Studien allein nicht immer zuverlässig darüber Auskunft geben, ob ein Stoff nach der Markteinführung zu allergologischen Problemen führt oder nicht.

Schließlich ist die Literaturrecherche zu Humandaten deswegen sinnvoll, weil für einige Komponenten von Epoxidharzsystemen nur wenige zuverlässige Daten zur Sensibilisierung aus Tier- oder in vitro-Versuchen vorliegen, aber (zumindest einige) Humandaten. Schließlich geben Berichte zur Sensibilisierung beim Menschen oft Aufschluss über geeignete Testmodalitäten bei der Diagnostik.

2. Beschreibung der verwendeten Methoden

In PubMed und in der IVDK-Literaturdatenbank wurde nach den Substanzen der abzuarbeitenden Liste in Verbindung mit den Stichworten „allergy“, „sensitization“, „human“, „patch test“, „dermatitis“ bzw. deren deutschen Übersetzungen gesucht. Einige weitere Literaturhinweise wurden aus ECHA-Dossiers und MAK-Begründungen entnommen.

Bei denjenigen Substanzen, die bereits im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 untersucht worden waren, wurde die Suche auf Publikationen aus den Jahren ab 2012 begrenzt, weil frühere Veröffentlichungen bereits in FP-0324 berücksichtigt sind.

Die gefundenen Veröffentlichungen wurden darauf hin geprüft, ob sie für die hier zu bearbeitende Fragestellung relevante Informationen enthalten. Arbeiten, in denen die Allergene bzw. Testsubstanzen unzureichend identifizierbar waren, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Ebenso wurden Einzelfallberichte nicht referiert, wenn die Exposition und/oder die Allergietestung nicht nachvollziehbar dargestellt waren. Alle verbleibenden Arbeiten wurden zusammenfassend referiert und bewertet.

Will man anhand von Humandaten das allergologische Risiko abschätzen, das von einem Stoff ausgeht, so ist es eigentlich erforderlich, die Zahl der Sensibilisierten zur Zahl der Exponierten in Beziehung zu setzen. Beide Zahlen sind aber leider nicht verfügbar. Während man jedoch die Zahl der Sensibilisierten anhand epidemiologischer Daten oder anderer Berichte in einigen Fällen zumindest grob orientierend abschätzen kann, gibt es zur Zahl der Exponierten keinerlei Daten. Um wenigstens für das Baugewerbe einen orientierenden Anhaltspunkt zur Verbreitung der jeweiligen Verbindung zu bekommen, wurde von GISBAU ausgewertet, wie häufig die Verbindung in den 3.692 dort vorliegenden Sicherheitsdatenblättern genannt wurde (Stand September 2011; 635 dieser Sicherheitsdatenblätter wurden nach 2005 erstellt). Da ein Epoxidharzsystem in der Regel aus zwei Komponenten besteht, und für jede Komponente ein eigenes Sicherheitsdatenblatt existiert, beziehen sich diese Informationen also auf ca. 1.850 Produkte. Über die verkaufte bzw. eingesetzte Menge der einzelnen Produkte liegen keine Informationen vor; die Anzahl der Nennungen bestimmter Komponenten in den Sicherheitsdatenblättern kann also nur eine grob orientierende Aussage zur Verbreitung des jeweiligen Stoffes in Epoxidharzsystemen geben. Wo es sinnvoll erscheint, werden diese Zahlen zu Beginn der jeweiligen Kapitel über die einzelnen Verbindungen kurz referiert.

Im Einzelnen wurden dabei die folgenden semiquantitativen Kategorisierungen verwendet:

Kategorie	Anzahl der bei GISBAU vorliegenden Sicherheitsdatenblätter mit der jeweiligen Komponente (Grundgesamtheit: n = 3.692)
sehr häufig / sehr weit verbreitet	> 350
häufig / weit verbreitet	100 - 350
selten / kaum verbreitet	10 - 99
sehr selten / fast nicht verbreitet	0 - 9

Außerdem werden zu Beginn jedes Abschnittes etwaige allergologische Besonderheiten des jeweiligen Stoffes herausgestellt.

Anschließend werden die Ergebnisse für jede Substanz in folgenden Abschnitten dargestellt:

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.
Diese Daten geben häufig, aber nicht immer, Aufschluss darüber, ob die Sensibilisierung gegen den betreffenden Stoff beim Menschen quantitativ eine große Rolle spielt oder nicht.
- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.
Hier werden Untersuchungen an Erkrankten, die eindeutig oder zumindest mit hoher Wahrscheinlichkeit gegenüber dem fraglichen Stoff exponiert waren, in Form von entsprechenden Epikutantest-Studien, Fallserien und/oder Einzelfallberichten berücksichtigt.
- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.
*Dieser Abschnitt gibt in erster Linie Publikationen wieder, in denen über Sensibilisierungen gegen den betreffenden Stoff berichtet wird, die nicht durch Exposition gegenüber dem Stoff selbst erworben wurden, sondern die auf dem Boden einer immunologischen Kreuzreaktion bei primärer Sensibilisierung gegen eine andere Substanz erworben wurden. Dieses Phänomen ist nur bei einem begrenzten Teil der hier zu besprechenden Substanzen relevant.
*Bei einigen Substanzen wurde bereits in den beiden ersten Abschnitten über Reaktionskopplungen oder Kreuzreaktionen berichtet. Zum Teil wird dann in diesem Abschnitt auf diese Arbeiten verwiesen.**
- Sensibilisierungsversuche am Menschen.
Dieser Abschnitt, der aufgrund einzelner Publikationen für wenige Substanzen (Epoxidharz auf Basis von Bisphenol A-diglycidylether (DGEBA), Diethylentriamin und Butylglycidylether) im Vorgängerprojekt FP-0324 enthalten war, wurde jetzt gestrichen, weil keine entsprechenden Veröffentlichungen gefunden wurden.
- Zusammenfassung und Bewertung.

3. Stoffdatenanalyse

3.1 Epoxidharze

3.1.1 Bisphenol A-Harze, CAS Nr. 025068-38-6

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Als Allergen der Standardreihe wird ein Epoxidharz auf Basis von Bisphenol A-diglycidylether (DGEBA) ungezielt bei allen Patienten epikutan getestet, die wegen des Verdachtes auf eine Kontaktallergie untersucht werden. Dieses DGEBA-Harz ist als einzige der hier zu bearbeitenden Substanzen Bestandteil der Standardreihe für den Epikutantest.

Teile der Ergebnisse der im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 vorgenommenen IVDK-Datenanalyse wurden 2016 veröffentlicht [Geier et al. 2016 a und b]. In den Jahren 2002 – 2011 lag die Quote von Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (Testkonzentration 1% Vas.) in den dem IVDK angeschlossenen dermatologischen Abteilungen bei 1,6% (1.453 von 93.406 Getesteten). Etwa die Hälfte der gegen DGEBA-Harz Sensibilisierten, bei denen Reaktivverdünner oder Härter getestet wurden (n = 615), war gegen einen Reaktivverdünner oder einen Härter sensibilisiert. Härter und Reaktivverdünner wurden nicht nur bei Patienten mit Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz getestet, sondern auch bei (2.800 – 12.800, je nach Substanz) Epoxidharz-negativen Patienten, wobei sich Reaktionsquoten von 0,1 – 0,9% ergaben. Anders herum betrachtet traten 16 – 62,5% der Sensibilisierungen gegen Härter und 7 – 22% der Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner ohne gleichzeitige Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz auf.

In den am IVDK beteiligten dermatologischen Abteilungen lag die alters- und geschlechtsstandardisierte Quote positiver Reaktionen auf das in der Epikutantest-Standardreihe enthaltene DGEBA-Epoxidharz (1% Vas.) in den Jahren 2010 bis 2014 um 1,5% (Minimum: 1,3% in 2010, Maximum: 1,9% in 2013) [Soemantri und Dickel 2015], und damit im Bereich der Quoten der vorhergehenden Jahre.

Weitere Analysen der IVDK-Daten zur Kontaktallergie gegen Komponenten von Epoxidharzsystemen sind Gegenstand eines weiteren Teilprojektes des IVDK im Rahmen des FP-0384.

In den Jahren 2005 bis 2009 testeten die Mitglieder der Dänischen Kontaktallergie-Gruppe insgesamt 20.808 Patienten epikutan. Eine retrospektive Auswertung der in der dortigen Datenbank erfassten Testungen zeigte, dass 275 Patienten (1,3%) positiv auf das im Rahmen der Standardreihe getestete DGEBA-Harz (1% Vas.) reagierten. Die Reaktionsquote war bei Männern höher als bei Frauen (1,9% vs. 1,0%). Per Fragebogen wurden die Sensibilisierten nach beruflichen Expositionen, klinischen Angaben und beruflichen Konsequenzen befragt. Es gingen 188 Antworten ein. 13% der Betroffenen waren Fabrikarbeiter, 11% arbeiteten in der Herstellung von Windkraftanlagen, 7% waren Maler und Lackierer, und 5% Fußbodenleger. In 43% der Fälle war ein Kleber die auslösende Epoxidharz-Exposition, in 30% eine Farbe, in 24% eine Oberflächenbeschichtung und in 18% eine Fußbodenbeschichtung. 36% der Betroffenen hatten weniger als 3 Monate mit Epoxidharze gearbeitet, bevor sich ein Ekzem entwickelte. Bei 26% lag dieser Zeitraum zwischen 3 und 11 Monaten, und bei 23% der Patienten zwischen 1 und 5 Jahren. 26% der Patienten mussten wegen der Epoxidharz-Allergie ihre Tätigkeit aufgeben [Bangsgaard et al. 2012].

Auch wenn es in der Arbeit nicht ausdrücklich erwähnt wird, so ist doch anzunehmen, dass Prodi und Mitarbeiter sich in ihrer retrospektiven Datenauswertung über die Epoxidharz-Allergie in Norditalien in den Jahren 1996 – 2010 auf die Ergebnisse von (den allgemein üblichen) Epikutantestungen mit einem DGEBA-Epoxidharz (1% Vas.) beziehen. In ihrer Population von 19.088 konsekutiven Ekzempatienten, die in 8 Kliniken untersucht wurden, fanden sie bei 0,89% eine entsprechende Sensibilisierung (Männer: 1,39%; Frauen: 0,64%). 52% der Betroffenen hatten ein Handekzem. Bei beiden Geschlechtern ergab sich ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Epoxidharz-Sensibilisierung in folgenden Berufsgruppen: Mechaniker, Holzverarbeiter und Chemiewerker. Bei Männern war das Risiko außerdem bei Landwirten, Fischern, Bauarbeitern und Arbeitslosen erhöht. Bei Bauarbeitern stieg das Risiko für eine Epoxidharz-Sensibilisierung im Untersuchungszeitraum signifikant an [Prodi et al. 2015].

Im Finnish Institute of Occupational Health (FIOH) wurde von November 1999 bis Mai 2011 nicht nur ein Epoxidharz auf Basis von DGEBA, sondern auch ein Epoxidharz auf Basis von Bisphenol F-diglycidylether (DGEBF) in der Standardreihe epikutan getestet. Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen publizierten 2014 eine retrospektive Analyse der

Testergebnisse [Aalto-Korte et al. 2014b]. Von den insgesamt 1972 getesteten Patienten reagierten 96 (4,9%) auf das DGEBA-Harz. (Die im Vergleich zu den oben referierten Daten aus anderen europäischen Ländern deutlich höhere Reaktionsquote erklärt sich aus der speziellen Patientenklientel des FIOH; dort werden ausschließlich Patienten mit beruflich bedingten Hautveränderungen untersucht.) Die Testkonzentration ist in der Arbeit zwar nicht ausdrücklich angegeben; aus anderen Publikationen des FIOH ist jedoch ersichtlich, dass die Testungen mit DGEBA-Harz 1% Vas. erfolgten. 61 der 96 Patienten mit Sensibilisierung gegen das DGEBA-Harz (63,5%) reagierten auch allergisch auf DGEBF-Harz.

Die Dänische Kontaktallergie-Gruppe analysierte retrospektiv Kontaktsensibilisierungen bei Arbeitern mit beruflich bedingtem Ekzem, die in den Jahren 2003 bis 2012 epikutan getestet wurden [Schwensen et al. 2014]. Es handelte sich insgesamt um 1.471 Patienten, davon 205 Maschinenbediener, 165 Beschäftigte in der Nahrungsmittelindustrie, 156 Mechaniker, 124 Maler und Lackierer, 43 Bauarbeiter und 48 Fliesenleger. Als Kontrollgruppe dienten 1471 alters- und geschlechts-gematchte Patienten ohne entsprechende Berufe. In der Untersuchungsgruppe waren Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe (4,1% vs. 1,1%; OR 3,87). Das höchste Risiko und die höchsten Sensibilisierungsfrequenzen hatten Bauarbeiter (11,6%; OR 4,83) und Fliesenleger (12,5%; OR 4,45). Es folgten Maler und Lackierer mit 8,1% Sensibilisierungen gegen DGEBA-Harz, allerdings ohne *signifikant* erhöhtes Risiko (OR 2,70).

Die Dänische Kontaktallergie-Gruppe analysierte außerdem gesondert retrospektiv die Kontaktallergie bei Malern und Lackierern mit Berufsdermatose, die zwischen 2001 und 2010 epikutan getestet wurden [Mose et al. 2012]. Von den 219 Betroffenen reagierten 18 (8%) auf Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% Vas.), und damit signifikant mehr als in einer Kontrollgruppe, in der 22 von 1095 Patienten (2%) reagierten.

Rui und Kollegen aus Triest, Italien, untersuchten retrospektiv Kontaktsensibilisierungen bei Patienten, die unter dem Verdacht auf eine Kontakallergie epikutan getestet wurden. Sie analysierten die Testergebnisse von 900 in der Bau-Branche Beschäftigten im Vergleich zu 4.372 im Büro Tätigen und führten eine multivariate Regressionsanalyse der Daten durch [Rui et al. 2012]. Die Bauarbeiter hatten ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Sensibilisierung gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (OR 3,80).

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

In einer schwedischen Publikation wurden Epikutantestergebnisse bei 8 Patienten beschrieben, die Rohrleitungen mit dem Linerverfahren sanierten, dabei gegenüber Epoxidharzsystemen exponiert waren, und an einem arbeitsabhängigen Ekzem litten [Berglind et al. 2012]. Sechs dieser 8 Patienten reagierten auf DGEBA-Harz (1% Vas.) und auf DGEBF-Harz (0,25% Vas.). Außerdem kam es zu positiven Reaktionen auf die folgenden Härter und Reaktivverdünner: Triethylentetramin (n=1 Patient; Testkonzentration 0,5% Vas.), m-Xylidendiamin (n=1; 0,1% Vas.), Phenylglycidylether (n=4; 0,25% Vas.), 1,6-Hexandiol-diglycidylether (n=2; 0,25% Vas.), 1,4-Butandiol-diglycidylether (n=2; 0,25% Vas.) und Trimethylolpropantriglycidylether (n=2; 0,25% Vas.). Nicht alle der positiv getesteten Epoxidharz-Komponenten waren in den aktuell verwendeten Produkten enthalten.

In einer retrospektiven Datenanalyse untersuchten kanadische Dermatologen den Nutzen von Epikutantestungen mit Epoxidharz-haltigen Produkten vom Arbeitsplatz der Patienten bei Fällen von beruflich bedingtem Kontaktekzem [Houle et al. 2012]. In der Zeit von Juli 2002 bis Juli 2011 wurden bei 24 Patienten entsprechende Produkte und, soweit verfügbar, auch Einzelkomponenten dieser Produkte getestet. Bei 13 dieser Patienten hatten diese Testungen einen diagnostischen Zusatznutzen. In 7 Fällen korrelierten Reaktionen auf standardisiert getestete Epoxidharz-Komponenten mit den beruflich verwendeten Produkten, und in weiteren 6 Fällen konnte die Sensibilisierung nur durch die Testung mit dem Berufsstoff, nicht aber mit den standardisiert erhältlichen Testsubstanzen diagnostiziert werden. Bei 6 Patienten wurde eine Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz festgestellt. Darüber hinaus reagierten 3 Patienten auf DGEBF-Harz, 2 auf Phenylglycidylether (und DGEBA-Harz), 1 auf m-Xylidendiamin und 1 Patient auf Diethylentriamin und gleichzeitig auch auf Triethylentetramin.

Kawamoto und Mitarbeiter untersuchten 20 Beschäftigte einer Firma, die Gebäudefundamente mit Epoxidharzen reparierte. Alle hatten Umgang mit einem neuen Produkt, und 11 von Ihnen litten an einem Ekzem. Das Produkt enthielt DGEBA, m-Xylidendiamin und Butylglycidylether. Es wurde spezifisches Immunglobulin G und E (IgG und IgE) gegen DGEBA, m-Xylidendiamin und Butylglycidylether und das Produkt bestimmt. Spezifisches IgE wurde in keinem Fall nachgewiesen. Alle 11 Ekzem-Patienten hatten spezifisches IgG gegen das Produkt, 3 von ihnen auch gegen DGEBA, und jeweils 1 Patient gegen m-Xylidendiamin bzw. Butylglycidylether. Fünf der 9 Exponierten ohne Ekzem hatten spezifisches IgG gegen das Produkt, aber keiner gegen eine der 3 genannten Komponenten. Die Autoren schlossen aus diesem Ergebnis, dass der Nachweis von spezifischem IgG nicht

nur als Expositionsmarker dienen kann, sondern auch als Hinweis auf die Ursache eines Ekzems [Kawamoto et al. 2015].

Aus Australien stammte der Fallbericht über eine Frau, die sich bei ihrer Freizeitbeschäftigung, der Malerei, durch den Umgang mit einem Beschichtungsharz („Glass Coat Resin“) gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA sensibilisierte [Lolatgis und Nixon 2015].

Eine 48jährige Patientin aus Istanbul, die sich als Kind in der Werkstatt ihres Vaters gegen Epoxidharz sensibilisiert hatte, erlitt beim Aufenthalt in ihrer Wohnung ein aerogenes Kontaktekzem. Weitere Untersuchungen zur Ursache dieses Ekzems zeigten, dass aus einer im selben Haus gelegenen Möbel-Reparaturwerkstatt Epoxidharz-Dämpfe über Lüftungsschächte in die Wohnung der Patientin gelangten [Özkaya 2012].

Goodson und Powell berichteten von einer Asiatin, die in einer Flugzeugfabrik mit Epoxidharz-Kleber arbeitete, und bei der eine arbeitsabhängige Konjunktivitis ohne jede Beteiligung der Haut auftrat. Im Epikutantest reagierte sie auf DGEBA- und DGEBF-Epoxidharz. Nach Meidung der aerogenen Epoxidharz-Exposition am Arbeitsplatz wurde die Patientin beschwerdefrei [Goodson und Powell 2014].

- Weitere Untersuchungen zur Epoxidharz-Allergie am Menschen.

Die meisten Aluminium-Tuben für pharmazeutische Salben sind innen mit Epoxidharz auf Basis von DBGEBA beschichtet. Es konnte gezeigt werden, dass DGEBA-Monomere und –Oligomere aus dieser Beschichtung in die Salbengrundlagen übergehen. Breuer und Kollegen untersuchten in einer Multicenter-Studie, ob die gemessenen Epoxidharz-Konzentrationen für Patienten mit bekannter DGEBA-Sensibilisierung ein Problem darstellen. Dazu wurde bei 11 gegen DGEBA-Harz Sensibilisierten ein wiederholter offener Anwendungstest (repeated open application test; ROAT) mit Macrogol-Salben mit 3 mg/kg, 30 mg/kg und 300 mg/kg DGEBA durchgeführt. Drei der 11 Patienten reagierten positiv auf die mittlere Konzentration, und weitere drei auf die höchste Konzentration. Die Kontrolluntersuchungen mit dem Vehikel und die Testungen mit der niedrigsten DGEBA-Konzentration blieben negativ. Die Autoren schlossen aus Ihren Ergebnissen, dass die Kontamination von Salben mit DGEBA-Monomeren und –Oligomeren aus der Innenbeschichtung von Salbentuben für Epoxidharz-Allergiker ein Risiko darstellt und bei einigen Patienten ausreicht, um ein allergisches Kontaktekzem auszulösen und zu unterhalten [Breuer et al. 2015].

Aus Kanada kam ein Bericht über 5 Patienten mit allergischem Kontaktekzem durch DGEBA-Harz, bei denen sich eine persistierende erhöhte UV-Empfindlichkeit, in 3 Fällen mit chronischer aktinischer Dermatitis, entwickelte [Kwok et al. 2013]. Allerdings entstand die Photosensitivität nur in zwei Fällen gleichzeitig mit dem allergischen Kontaktekzem. Sie hielt bei allen 5 Patienten länger als zwei Jahre an; nur in einem Fall ging sie nach der konsequenten und langfristigen Meidung des Epoxidharzkontaktes zurück. Die Autoren diskutierten mögliche pathogenetische Mechanismen, räumten jedoch auch ein, dass es sich (zumindest zum Teil) um zufällige Koinzidenzen gehandelt haben könnte.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

Die häufigsten und wichtigsten Verursacher der Kontaktallergie gegen Epoxidharz beim Menschen sind nach wie vor Monomere und Oligomere (mit einem Molekulargewicht von unter 900) eines Epoxidharzes auf Basis von DGEBA. Bei ungezielten Testungen an Klinikpatienten mit Verdacht auf allergisches Kontaktekzem findet man auch weiterhin 1-2% Sensibilisierte. Männer sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Patienten mit Verdacht auf berufsbedingte Kontaktallergie sind deutlich häufiger gegen DGEBA-Harz sensibilisiert; bevorzugt sind Bauarbeiter, Fliesenleger, Maler und Lackierer betroffen.

3.1.2 Reaktionsprodukt Bisphenol A Epichlorhydrin, CAS Nr. 025085-99-8

Unter dieser CAS Nr., die ebenfalls ein Epoxidharz auf Basis von DGEBA bezeichnet, sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

Das DGEBA-Harz wird unter der CAS Nr. 025068-38-6 besprochen.

3.1.3 Bisphenol-A-Epichlorhydrin MW 340, CAS Nr. 001675-54-3

Diese CAS Nr. bezeichnet das Monomer des Epoxidharzes auf Basis von DGEBA, also das DGEBA selbst. Tierversuche zeigten, dass dieses Monomer der stärkste Sensibilisator unter den Mono- und Oligomeren des DGEBA-Harzes ist (siehe ausführliche Darstellung im Vorgängerprojekt FP-0324).

Die Untersuchungen zur Sensibilisierung am Menschen wurden nicht mit reinem DGEBA-Monomer durchgeführt, sondern mit einem Harz mit niedrigem durchschnittlichem Molekulargewicht, das einen hohen Anteil von Mono- und Oligomeren (insbesondere von Oligomeren mit einem Molekulargewicht von unter 900) hat.

Dieses DGEBA-Harz wird unter der CAS Nr. 025068-38-6 besprochen.

3.1.4 Bisphenol F-Harze, CAS Nr. 009003-36-5

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

In den meisten kalt härtenden Epoxidharzsystemen ist aus technischen Gründen sowohl Bisphenol A- als auch Bisphenol F-Epoxidharz enthalten. Dementsprechend ist für die Betroffenen eine Ko-Exposition gegenüber beiden Stoffen gegeben. Im Baugewerbe ist Bisphenol F-Harz sehr weit verbreitet, wie die Nennung in 591 bei GISBAU vorliegenden Sicherheitsdatenblättern zeigt.

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Im FIOH wurde von November 1999 bis Mai 2011 nicht nur ein Epoxidharz auf Basis von DGEBA, sondern auch ein Epoxidharz auf Basis von DGEBF in der Standardreihe epikutan getestet. Die Testkonzentration des DGEBF-Harzes lag zunächst bei 1%, später bei 0,25% Vas. Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen publizierten 2014 eine retrospektive Analyse der Testergebnisse [Aalto-Korte et al. 2014b]. Von den insgesamt 1972 getesteten Patienten reagierten 96 (4,9%) auf das DGEBA-Harz, und von diesen 61 (63,5% von 96) auch auf das DGEBF-Harz. Auf DGEBF-Harz 1% Vas. ergaben sich insgesamt 2,7% allergische Reaktionen (32 von 1198 Pat.); auf DGEBF-Harz 0,25% Vas. wurden 4,4% positive Reaktionen beobachtet (34 von 774 Pat.). Insgesamt reagierten also 66 Patienten (3,3%) positiv auf DGEBF-Harz, und in nur 5 dieser Fälle war keine DGEBA-Harz-Sensibilisierung festzustellen. Bei 45 der Patienten mit gleichzeitiger Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz und DGEBF-Harz konnte die Exposition genauer ermittelt werden; in 22 Fällen wurden DGEBF-Harz-haltige Produkte verwendet. Die Exposition kam in völlig unterschiedlichen beruflichen Zusammenhängen vor. Da es (1) auf dem finnischen Markt nur sehr wenige Epoxidharz-Produkte gibt, die DGEBF-Harz, aber kein DGEBA-Harz enthalten, und (2) die immunologische Kreuzreaktivität zwischen DGEBA-Harz und DGEBF-Harz bekannt und tierexperimentell bewiesen ist, kamen die Autoren angesichts ihrer Daten zu dem Schluss, dass ein Kontaktallergie-Screening mit DGEBF-Harz nicht sinnvoll ist. Vielmehr sollte das DGEBF-Harz ggf. gezielt getestet werden.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

In einer retrospektiven Datenanalyse untersuchten kanadische Dermatologen den Nutzen von Epikutantestungen mit Epoxidharz-haltigen Produkten vom Arbeitsplatz der Patienten bei Fällen von beruflich bedingtem Kontaktekzem [Houle et al. 2012]. In der Zeit von Juli 2002 bis Juli 2011 wurden bei 24 Patienten entsprechende Produkte und, soweit verfügbar, auch deren Einzelkomponenten getestet. Bei 13 dieser Patienten hatten diese Testungen einen diagnostischen Zusatznutzen. In 7 Fällen korrelierten Reaktionen auf standardisiert getestete Epoxidharz-Komponenten mit den beruflich verwendeten Produkten, und in weiteren 6 Fällen konnte die Sensibilisierung nur durch die Testung mit dem Berufsstoff, nicht aber mit den standardisiert erhältlichen Testsubstanzen diagnostiziert werden. Bei 6 Patienten wurde eine Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz festgestellt. Darüber hinaus reagierten 3 Patienten auf DGEBF-Harz, 2 auf Phenylglycidylether (und DGEBA-Harz), 1 auf m-Xylidendiamin und 1 auf Diethylentriamin und gleichzeitig auch auf Triethylentetramin.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung. Auch Mono- und Oligomere des Epoxidharzes auf Basis von DGEBF sind starke Sensibilisatoren. Im Tierversuch wurden immunologische Kreuzreaktionen zwischen DGEBA und einigen Isomeren des DGEBF nachgewiesen. Sensibilisierungen gegen DGEBF-Harze sind beim Menschen nicht ganz so häufig wie Sensibilisierungen gegen DGEBA-Harze. Bei exponierten Personen besteht in der Regel eine Ko-Exposition gegenüber DGEBA- und DGEBF-Harz, da kalt härtende Epoxidharzsysteme meist beides enthalten. Gleichzeitige allergische Reaktionen auf DGEBA- und DGEBF-Harz können daher sowohl durch immunologische Kreuzreaktionen als auch durch Ko-Sensibilisierung bei Ko-Exposition bedingt sein.

3.1.5 Bisphenol-F-Epichlorhydrin, CAS Nr. 028064-14-4

Unter dieser CAS Nr., die ebenfalls ein Epoxidharz auf Basis von DGEHF bezeichnet, sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

Das DGEHF-Harz wird unter der CAS Nr. 009003-36-5 besprochen.

3.1.6 Epoxidharz-Monomere aus O'Boyle et al. 2012 und 2014

2,2-Bis[4-(2,3-epoxypropoxy)cyclohexyl]propan (CAS Nr. 13410-58-7) und

2,2-Bis[4-(2,3-epoxypropyl)phenyl]propan (CAS Nr. 3530-44-7)

Bisher wurde nur eine einzige Untersuchung zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen mit diesen Epoxidharz-Monomeren [siehe O'Boyle et al. 2012 und 2014] veröffentlicht.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

In der Abteilung für Dermatochemie der Universität Göteborg wurden 2,2-Bis[4-(2,3-epoxypropoxy)cyclohexyl]propan (CAS Nr. 13410-58-7) und 2,2-Bis[4-(2,3-epoxypropyl)phenyl]propan (CAS Nr. 3530-44-7) in einer Verdünnungsreihe (0,92% bis 0,92 ppm in Vaseline) bei 11 Patienten mit nachgewiesener Sensibilisierung gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA epikutan getestet. Drei dieser 11 Patienten reagierten positiv (allergisch) auf 2,2-Bis[4-(2,3-epoxypropoxy)cyclohexyl]propan (CAS Nr. 13410-58-7) 0,92% Vas. Einer dieser drei Patienten (der auch auf DGEBA-Harz bis 0,0032% Vas. positiv reagierte, mithin hochgradig sensibilisiert war) reagierte in der Verdünnungsreihe bis 0,092% Vas. Die beiden anderen Patienten reagierten nur auf die höchste Konzentration von 2,2-Bis[4-(2,3-epoxypropoxy)cyclohexyl]propan (CAS Nr. 13410-58-7). Auf 2,2-Bis[4-(2,3-epoxypropyl)phenyl]propan (CAS Nr. 3530-44-7) reagierte keiner der 11 getesteten Patienten.

Die Autoren schlussfolgerten, dass kaum oder keine Kreuzreaktionen zwischen DGEBA-Harz und den beiden untersuchten Epoxidharz-Monomeren bestehen [Hagvall et al. 2016].

- Zusammenfassung und Bewertung.

Die Untersuchung gibt Anlass zu der Vermutung, dass hier Epoxidharz-Monomere gefunden wurden, die nur wenig oder nicht mit DGEBA-Harz kreuzreagieren. Aufgrund der geringen Probandenzahl sind weiterreichende Schlussfolgerungen hinsichtlich der sensibilisierenden Wirkung am Menschen jedoch nicht möglich.

3.2 Härter, aromatische Amine

3.2.1 4,4'-Diaminodiphenylmethan, CAS Nr. 000101-77-9

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

In Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe spielt 4,4'-Diaminodiphenylmethan wegen seiner Toxizität aktuell praktisch keine Rolle. Bei GISBAU liegen nur 6 Sicherheitsdatenblätter vor, in denen 4,4'-Diaminodiphenylmethan als Bestandteil genannt ist, und keines davon wurden nach 2005 erstellt. Basis dieser Auswertung sind 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen

und

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Da Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit, wie es auf der Haut gegeben ist, zunächst zu 4,4'-Diaminodiphenylmethan reagiert, ist bei Exposition gegenüber Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat immer auch eine Exposition gegenüber 4,4'-Diaminodiphenylmethan gegeben, die zu einer entsprechenden Sensibilisierung führen kann. Außerdem kann Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat auch auf einem anderen Weg auf und in der Haut zu 4,4'-Diaminodiphenylmethan umgewandelt werden. Daher wird 4,4'-Diaminodiphenylmethan auch als Surrogat-Epikutantestsubstanz bei Verdacht auf Kontaktallergie gegen Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat empfohlen [Frick-Engfeldt et al. 2007].

Sensibilisierungen gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan können auch Ausdruck einer immunologischen Kreuzreaktion bei primärer Sensibilisierung gegen andere in Para-Stellung disubstituierte aromatische Amine, insbesondere p-Phenylendiamin oder p-Aminoazobenzol, sein [Uter et al. 2002].

Nach einer Häufung von Fällen von Kontaktallergie gegen Isocyanate wurden in zwei dermatologischen Abteilungen (Malmö, Schweden und Leuven, Belgien) in den Jahren 2002 bis 2010 insgesamt 6.190 konsekutive (also nicht selektionierte) Ekzempatienten mit Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat, polymerem Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat und 4,4'-Diaminodiphenylmethan epikutan getestet [Engfeldt et al. 2013]. In Leuven reagierten

18 von 500 Patienten (3,6%) auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan, aber keiner auf Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat. 14 dieser 18 Patienten (78%) waren auch gegen p-Phenylendiamin (PPD) sensibilisiert. In Malmö waren allergische Reaktionen auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan seltener: 5 von 560 Patienten (0,9%) reagierten auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan 0,5% Vas., und 31 von 5130 (0,6%) auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan 0,25% Vas. Von diesen insgesamt 36 Patienten mit positiver Reaktion auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan reagierten 23 (64%) allergisch auf p-Phenylendiamin, 17 (47%) auf einen Textilfarben-Mix mit Azofarbstoffen, 5 (14%) auf einen Schwarzgummi-Mix mit Derivaten des N-Isopropyl-N'-phenyl-p-phenylendiamin (IPPD), und 10 (28%) auf Benzocain. Drei der 36 Patienten mit Sensibilisierung gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan reagierten auch auf Epoxidharze auf Basis von DGEBA und/oder DGEBF; eine klinische Relevanz der Reaktionen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Acht Patienten reagierten positiv auf Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat oder polymeres Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat, und alle diese Patienten reagierten auch auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen veröffentlichten eine retrospektive Analyse von Daten des FIOH über die dort in den Jahren 1991 bis 2013 beobachteten Sensibilisierungen gegen Härter in Epoxidharzsystemen [Aalto-Korte et al. 2014a]. Dabei haben die Autorinnen 4,4'-Diaminodiphenylmethan ausdrücklich von der Analyse ausgenommen, weil Sensibilisierungen gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan zwar häufig beobachtet werden, aber die jeweilige Sensibilisierungsquelle oft nur schwer aufzuklären ist. Die meisten im FIOH beobachteten Sensibilisierungen gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan konnten auf eine Exposition gegenüber Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat (MDI) oder auf eine Kreuzallergie gegen so genannte Parastoffe erklärt werden [Aalto-Korte et al. 2012]. Eine Sensibilisierung gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan durch den Kontakt mit 4,4'-Diaminodiphenylmethan in einem Epoxidharzsystem konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.
Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.
Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

4,4'-Diaminodiphenylmethan wird aktuell praktisch nicht mehr in Epoxidharzsystemen eingesetzt. In Reihenuntersuchungen findet man oft positive Reaktionen auf 4,4'-Diaminodiphenylmethan, deren klinische Relevanz jedoch meist schwer zu klären ist. Nur in seltenen Fällen kann tatsächlich Exposition gegenüber 4,4'-Diaminodiphenylmethan nachgewiesen werden.

Sensibilisierungen gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan können Ausdruck einer immunologischen Kreuzreaktion bei primärer Sensibilisierung gegen andere in Para-Stellung disubstituierte aromatische Amine, insbesondere p-Phenylendiamin oder p-Aminoazobenzol, sein. Da Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit, wie es auf der Haut gegeben ist, zunächst zu 4,4'-Diaminodiphenylmethan reagiert, ist bei Exposition gegenüber Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat immer auch eine Exposition gegenüber

4,4'-Diaminodiphenylmethan gegeben, die zu einer entsprechenden Sensibilisierung führen kann. Außerdem kann Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat auch auf einem anderen Weg auf und in der Haut zu 4,4'-Diaminodiphenylmethan ungewandelt werden. Daher wird 4,4'-Diaminodiphenylmethan auch als Surrogat-Epikutantestsubstanz bei Verdacht auf Kontaktallergie gegen Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat empfohlen.

3.3 Härter, aliphatische Amine

3.3.1 Ethylendiamin, CAS Nr. 000107-15-3

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Ethylendiamin wird nicht nur in Epoxidharzsystemen, sondern auch als Hilfsstoff in Schmierstoffen und Medikamenten verwendet. Sensibilisierungen, die beim Menschen insgesamt eher selten beschrieben werden, können also durch recht unterschiedliche Expositionen erworben werden. Oft ist die klinische Relevanz einer positiven Testreaktion nicht eindeutig zu klären. Aus dem Gesagten ergibt sich, dass ggf. die Sensibilierungsquelle durchaus nicht immer ein Epoxidharzsystem sein muss, wo Ethylendiamin insgesamt offenbar sehr selten eingesetzt wird (Nennung in nur 9 Sicherheitsdatenblättern bei GISBAU, davon keines nach 2005 erstellt [Kersting 2011]).

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen veröffentlichten eine retrospektive Analyse von Daten des FIOH über die dort in den Jahren 1991 bis 2013 beobachteten Sensibilisierungen gegen Härter in Epoxidharzsystemen [Aalto-Korte et al. 2014a]. Ethylendiamindihydrochlorid 1% Vas. wurde dort bei insgesamt 641 Patienten epikutan getestet, von denen 2 (0,3%) positiv reagierten. In beiden Fällen stand die Sensibilisierung jedoch nicht mit einer Exposition gegenüber Epoxidharzen in Zusammenhang; eine Kontaktallergie gegen DGEBA-Harz lag in beiden Fällen nicht vor.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.
Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.
Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

Ethylendiamin wird nicht nur in Epoxidharzsystemen eingesetzt, sondern auch als Hilfsstoff in Schmierstoffen und Medikamenten verwendet. Ethylendiamin ist als Allergen mit sensibilisierenden Eigenschaften sowohl an der Haut als auch an den Atemwegen gut bekannt. Im Zusammenhang mit dem Einsatz von Epoxidharzsystemen wurden nur einzelne Fälle von Kontaktallergien beschrieben, was an der geringen Verbreitung von Ethylendiamin in Epoxidharzsystemen liegen dürfte.

3.3.2 Diethylentriamin, CAS Nr. 000111-40-0

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

In Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe scheint Diethylentriamin kaum verbreitet zu sein. Bei GISBAU liegen nur 65 Sicherheitsdatenblätter vor, in denen Diethylentriamin als Bestandteil genannt ist, davon wurden 10 nach 2005 erstellt. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Teile der Ergebnisse der IVDK-Datenanalyse, die im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 vorgenommen wurden, wurden 2016 veröffentlicht [Geier et al. 2016 a und b]. In den Jahren 2002 – 2011 lag in den dem IVDK angeschlossenen dermatologischen Abteilungen die Quote von Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% Vas.) bei 1,6% (1.453 von 93.406 Getesteten). Etwa die Hälfte der getesteten Betroffenen war auch gegen einen Reaktivverdünner oder einen Härter sensibilisiert. Unter den (bei 290 – 580 Epoxidharz-positiven Patienten) getesteten Härtern war m-Xylidendiamin das häufigste Allergen (18%), gefolgt von Isophorondiamin (10%), Trimethylhexamethylen-diamin (5%), Diethylentriamin (4%) und Triethylentetramin (2%). Härter und Reaktivverdünner wurden nicht nur bei Patienten mit Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz getestet, sondern auch bei (2.800 – 12.800) Epoxidharz-negativen Patienten, wobei sich Reaktionsquoten von 0,1 – 0,9% ergaben. Anders herum betrachtet traten 16 – 62,5% der Sensibilisierungen gegen Härter und 7 – 22% der Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz auf. Um die unterschiedlichen Reaktionshäufigkeiten auf die einzelnen Härter zu der – unbekannt – Zahl der Exponierten in Beziehung zu setzen, wurde hilfsweise als Maß der beruflichen Verbreitung der Härter in Produkten für das Baugewerbe die Häufigkeit der Nennung des jeweiligen Härters in Sicherheitsdatenblättern genommen, die bei GISBAU vorliegen. Aus der Sensibilisierungsfrequenz und der Häufigkeit der Nennungen in den Sicherheitsdatenblättern wurde ein Quotient gebildet. Anhand dieses Quotienten ergab sich folgendes Ranking der „expositionbezogenen Sensibilisierungshäufigkeit“: m-Xylidendiamin > Diethylentriamin > Trimethylhexamethylen-diamin > Isophorondiamin > Triethylentetramin.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen veröffentlichten 2014 eine retrospektive Analyse von Daten des FIOH über die dort in den Jahren 1991 bis 2013 beobachteten Sensibilisierungen gegen Härter in Epoxidharzsystemen [Aalto-Korte et al. 2014a]. Von insgesamt 645 mit Diethylentriamin getesteten Patienten zeigten 9 (1,4%) eine allergische Reaktion. Im Laufe der Jahre wurden dabei zwei verschiedene Testkonzentrationen (0,5% bzw. 1% Vas.) verwendet. Bei 7 der 9 gegen Diethylentriamin sensibilisierten Patienten konnte Diethylentriamin in den am Arbeitsplatz verwendeten Produkten nachgewiesen werden. Alle hatten sich in den 1990er Jahren sensibilisiert.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

In einer retrospektiven Datenanalyse untersuchten kanadische Dermatologen den Nutzen von Epikutantestungen mit Epoxidharz-haltigen Produkten vom Arbeitsplatz der Patienten bei Fällen von beruflich bedingtem Kontaktekzem [Houle et al. 2012]. Bei 24 Patienten wurden in der Zeit von Juli 2002 bis Juli 2011 entsprechende Produkte und, soweit verfügbar, auch Einzelkomponenten getestet. Bei 13 dieser Patienten hatten diese Testungen einen diagnostischen Zusatznutzen. In 7 Fällen korrelierten Reaktionen auf standardisiert getestete Epoxidharz-Komponenten mit den beruflich verwendeten Produkten, und in weiteren 6 Fällen konnte die Sensibilisierung nur durch die Testung mit dem Berufsstoff, nicht aber mit den standardisiert erhältlichen Testsubstanzen diagnostiziert werden. Bei 6 Patienten wurde eine Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz festgestellt. Darüber hinaus reagierten 3 Patienten auf DGEBF-Harz, 2 auf Phenylglycidylether (und DGEBA-Harz), 1 auf m-Xylidendiamin und 1 auf Diethylentriamin und gleichzeitig auch auf Triethylentetramin.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine grundlegende Änderung der Bewertung. Sensibilisierungen gegen Diethylentriamin werden bei exponierten Personen nicht selten beobachtet. Insgesamt ist die absolute Zahl der gegen Diethylentriamin Sensibilisierten aber offenbar nicht sehr hoch, was wahrscheinlich durch die aktuell eher geringe Verbreitung von Diethylentriamin in Epoxidharzsystemen bedingt ist. Die vergleichsweise hohe „expositionsbetragene Sensibilisierungshäufigkeit“, die im Vorgängerprojekt FP-0324 festgestellt wurde, lässt vermuten, dass bei größerer Verbreitung von Diethylentriamin in Epoxidharzsystemen wahrscheinlich mit mehr Sensibilisierungen zu rechnen wäre.

3.3.3 Dipropylen-triamin, CAS Nr. 000056-18-8

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

In Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe scheint Dipropylen-triamin keine nennenswerte Rolle zu spielen. Bei GISBAU liegen nur 2 Sicherheitsdatenblätter vor, in denen Dipropylen-triamin als Bestandteil genannt ist. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen veröffentlichten 2014 eine retrospektive Analyse von Daten des FIOH über die dort in den Jahren 1991 bis 2013 beobachteten Sensibilisierungen gegen Härter in Epoxidharzsystemen [Aalto-Korte et al. 2014a]. Dipropylen-triamin 0,5% Vas. wurde seit Mai 2006 bei 183 Patienten epikutan getestet, wobei keine positiven Reaktionen beobachtet wurden.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.
Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.
Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich insofern eine Änderung der Bewertung, als nunmehr auch umfangreichere Daten aus dem FIOH vorliegen. Insgesamt kann man jetzt davon ausgehen, dass Sensibilisierungen gegen Dipropylen-triamin selten sind. Dipropylen-triamin ist aktuell in Epoxidharzsystemen offenbar nicht sehr weit verbreitet.

3.3.4 Trimethylhexamethyldiamin, CAS Nr. 025620-58-0

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Diese CAS-Nummer bezeichnet ebenso wie die unter 3.3.12 genannte CAS Nr. 25513-64-8 das Isomergemisch aus 2,2,4-Trimethylhexan-1,6-diamin (CAS Nr. 3236-53-1) und 2,4,4-Trimethylhexan-1,6-diamin (CAS Nr. 3236-54-2).

Trimethylhexamethyldiamin ist offenbar als Härter in Epoxidharzsystemen, die im Baugewerbe verwendet werden, weit verbreitet: Bei GISBAU wurden 320 Sicherheitsdatenblätter gefunden, in denen Trimethylhexamethyldiamin genannt war, davon stammten 57 aus den Jahren 2006-2011. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Teile der Ergebnisse der IVDK-Datenanalyse, die im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 vorgenommen wurden, wurden 2016 veröffentlicht [Geier et al. 2016 a und b]. In den Jahren 2002 – 2011 lag in den dem IVDK angeschlossenen dermatologischen Abteilungen die Quote von Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% Vas.) bei 1,6% (1.453 von 93.406 Getesteten). Etwa die Hälfte der getesteten Betroffenen war auch gegen einen Reaktivverdünner oder einen Härter sensibilisiert. Unter den (bei 290 – 580 Epoxidharz-positiven Patienten) getesteten Härtern war m-Xylidendiamin das häufigste Allergen (18%), gefolgt von Isophorondiamin (10%), Trimethylhexamethyldiamin (5%), Diethylentriamin (4%) und Triethylentetramin (2%). Härter und Reaktivverdünner wurden nicht nur bei Patienten mit Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz getestet, sondern auch bei (2.800 – 12.800) Epoxidharz-negativen Patienten, wobei sich Reaktionsquoten von 0,1 – 0,9% ergaben. Anders herum betrachtet traten 16 – 62,5% der Sensibilisierungen gegen Härter und 7 – 22% der Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz auf. Um die unterschiedlichen Reaktionshäufigkeiten auf die einzelnen Härter zu der – unbekanntenen – Zahl der Exponierten in Beziehung zu setzen, wurde hilfsweise als Maß der beruflichen Verbreitung der Härter in Produkten für das Baugewerbe die Häufigkeit der Nennung des jeweiligen Härters in Sicherheitsdatenblättern genommen, die bei GISBAU vorliegen. Aus der

Sensibilisierungsfrequenz und der Häufigkeit der Nennungen in den Sicherheitsdatenblättern wurde ein Quotient gebildet. Anhand dieses Quotienten ergab sich folgendes Ranking der „expositionsbezogenen Sensibilisierungshäufigkeit“: m-Xylidendiamin > Diethylentriamin > Trimethylhexamethyldiamin > Isophorondiamin > Triethylentetramin.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen veröffentlichten 2014 eine retrospektive Analyse von Daten des FIOH über die dort in den Jahren 1991 bis 2013 beobachteten Sensibilisierungen gegen Härter in Epoxidharzsystemen [Aalto-Korte et al. 2014a]. Dort wurde bei 541 Patienten ein Gemisch aus 2,2,4-Trimethylhexan-1,6-diamin und 2,4,4-Trimethylhexan-1,6-diamin (CAS Nummern des Gemisches: 25620-58-0 und 25513-64-8) epikutan getestet. Die Testkonzentration lag ab November 1995 bei 1% Vas. und wurde im Mai 2006 auf 0,32% Vas. abgesenkt. Insgesamt wurden 6 positive Reaktionen beobachtet, davon 5 (1,4% von 358 Getesteten) auf die höhere Testkonzentration, und 1 (0,5% von 183 Getesteten) auf die niedrigere Konzentration. Alle diese Patienten reagierten auch auf DGEBA-Harz.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich insofern eine Änderung der Bewertung, als nunmehr auch umfangreichere Daten aus dem FIOH vorliegen. Insgesamt kann man jetzt davon ausgehen, dass Sensibilisierungen gegen Trimethylhexamethyldiamin selten sind. Trimethylhexamethyldiamin ist offenbar als Härter in Epoxidharzsystemen, die im Baugewerbe verwendet werden, weit verbreitet. Im Vergleich dazu sind Berichte über Sensibilisierungen beim Menschen selten. Unter den Härtern, deren im IVDK beobachtete Sensibilisierungshäufigkeiten im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 untersucht wurden, nahm Trimethylhexamethyldiamin bzgl. der expositionsbezogenen Sensibilisierungsfrequenz einen mittleren Platz ein.

3.3.5 Triethylentetramin, CAS Nr. 000112-24-3

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Triethylentetramin wird offenbar als Härter in Epoxidharzsystemen, die im Baugewerbe verwendet werden, häufig, aber nicht so oft wie Trimethylhexamethyldiamin eingesetzt. Bei GISBAU wurden 138 Sicherheitsdatenblätter gefunden, in denen Triethylentetramin genannt war, davon stammten 21 aus den Jahren 2006-2011. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Teile der Ergebnisse der IVDK-Datenanalyse, die im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 vorgenommen wurden, wurden 2016 veröffentlicht [Geier et al. 2016 a und b]. In den Jahren 2002 – 2011 lag in den dem IVDK angeschlossenen dermatologischen Abteilungen die Quote von Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% Vas.) bei 1,6% (1.453 von 93.406 Getesteten). Etwa die Hälfte der getesteten Betroffenen war auch gegen einen Reaktivverdünner oder einen Härter sensibilisiert. Unter den (bei 290 – 580 Epoxidharz-positiven Patienten) getesteten Härttern war m-Xylidendiamin das häufigste Allergen (18%), gefolgt von Isophorondiamin (10%), Trimethylhexamethyldiamin (5%), Diethylentriamin (4%) und Triethylentetramin (2%). Härter und Reaktivverdünner wurden nicht nur bei Patienten mit Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz getestet, sondern auch bei (2.800 – 12.800) Epoxidharz-negativen Patienten, wobei sich Reaktionsquoten von 0,1 – 0,9% ergaben. Anders herum betrachtet traten 16 – 62,5% der Sensibilisierungen gegen Härter und 7 – 22% der Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz auf. Um die unterschiedlichen Reaktionshäufigkeiten auf die einzelnen Härter zu der – unbekannt – Zahl der Exponierten in Beziehung zu setzen, wurde hilfsweise als Maß der beruflichen Verbreitung der Härter in Produkten für das Baugewerbe die Häufigkeit der Nennung des jeweiligen Härters in Sicherheitsdatenblättern genommen, die bei GISBAU vorliegen. Aus der Sensibilisierungsfrequenz und der Häufigkeit der Nennungen in den Sicherheitsdatenblättern wurde ein Quotient gebildet. Anhand dieses Quotienten ergab sich folgendes Ranking der „expositionbezogenen Sensibilisierungshäufigkeit“: m-Xylidendiamin > Diethylentriamin > Trimethylhexamethyldiamin > Isophorondiamin > Triethylentetramin.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen veröffentlichten 2014 eine retrospektive Analyse von Daten des FIOH über die dort in den Jahren 1991 bis 2013 beobachteten Sensibilisierungen gegen Härter in Epoxidharzsystemen [Aalto-Korte et al. 2014a]. Triethylentetramin 0,5% Vas. wurde bei 647 Patienten epikutan getestet, von denen 2 (0,3%) positiv reagierten. Eine Exposition gegenüber Triethylentetramin konnte bei diesen Patienten nicht nachgewiesen werden. Beide reagierten auch auf DGEBA-Harz und Diethylentriamin (CAS 111-40-0).

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

In einer retrospektiven Datenanalyse untersuchten kanadische Dermatologen den Nutzen von Epikutantestungen mit Epoxidharz-haltigen Produkten vom Arbeitsplatz der Patienten bei Fällen von beruflich bedingtem Kontaktekzem [Houle et al. 2012]. Bei 24 Patienten wurden in der Zeit von Juli 2002 bis Juli 2011 entsprechende Produkte und, soweit verfügbar, auch Einzelkomponenten getestet. Bei 13 dieser Patienten hatten diese Testungen einen diagnostischen Zusatznutzen. In 7 Fällen korrelierten Reaktionen auf standardisiert getestete Epoxidharz-Komponenten mit den beruflich verwendeten Produkten, und in weiteren 6 Fällen konnte die Sensibilisierung nur durch die Testung mit dem Berufsstoff, nicht aber mit den standardisiert erhältlichen Testsubstanzen diagnostiziert werden. Bei 6 Patienten wurde eine Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz festgestellt. Darüber hinaus reagierten 3 Patienten auf DGEBF-Harz, 2 auf Phenylglycidylether (und DGEBA-Harz), 1 auf m-Xylidendiamin und 1 auf Diethylentriamin und gleichzeitig auch auf Triethylentetramin.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung. Allergische Reaktionen auf Triethylentetramin werden beim Menschen insgesamt nur selten beobachtet.

3.3.6 N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan, CAS Nr. 000109-55-7

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan (syn. 3-Dimethylaminopropylamine; 3-Aminopropyl-dimethylamin) ist in Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe offenbar kaum verbreitet. Nach Informationen von GISBAU wurde N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan in nur 18 Sicherheitsdatenblättern gefunden, davon 6 aus den Jahren 2006-2011. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter [Kersting 2011].

Sensibilisierungen gegen N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan sind durch andere Expositionen als Epoxidharzsysteme bekannt. Cocamidopropylbetain (CAS 61789-40-0) ist eine oberflächenaktive Verbindung, die sehr weit verbreitet in Flüssigseifen, Duschgels, Shampoos, Zahnpasten, Körperpflegeprodukten, Kosmetika usw. eingesetzt wird, und als Verunreinigung N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan enthalten kann [Schnuch et al. 2011]. In den 1990er Jahren wurden zunehmend allergische Reaktionen auf Cocamidopropylbetain beobachtet [de Groot et al. 1995]. Genauere Untersuchungen ergaben jedoch Hinweise darauf, dass nicht das Cocamidopropylbetain selbst, sondern sehr wahrscheinlich das als Verunreinigung enthaltene N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan das verantwortliche Allergen war [Angelini et al. 1995, Foti et al. 2003].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen veröffentlichten 2014 eine retrospektive Analyse von Daten des FIOH über die dort in den Jahren 1991 bis 2013 beobachteten Sensibilisierungen gegen Härter in Epoxidharzsystemen [Aalto-Korte et al. 2014a]. Dort wurde N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan zunächst 1%, später 0,5% Vas. bei insgesamt 542 Patienten epikutan getestet, von denen 2 (0,4%) positiv reagierten. In beiden Fällen stand die Sensibilisierung jedoch nicht mit einer Exposition gegenüber Epoxidharzen in Zusammenhang, sondern wurde durch Produkte erworben, die Cocamidopropylbetain enthielten.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt keine Änderung der Bewertung.

Zwar liegen nunmehr auch umfangreichere Daten aus dem FIOH vor. Sensibilisierungen gegen N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan wurden dort jedoch nicht im Zusammenhang mit Epoxidharzsystemen beobachtet.

3.3.7 Tetraethylenpentamin, CAS Nr. 000112-57-2

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Tetraethylenpentamin ist in Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe kaum verbreitet. Nach Informationen von GISBAU wurde Tetraethylenpentamin in 94 Sicherheitsdatenblättern gefunden, davon 21 aus den Jahren 2006-2011. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen veröffentlichten 2014 eine retrospektive Analyse von Daten des FIOH über die dort in den Jahren 1991 bis 2013 beobachteten Sensibilisierungen gegen Härter in Epoxidharzsystemen [Aalto-Korte et al. 2014a]. Tetraethylenpentamin 0,1% Vas. wurde bei 579 Patienten epikutan getestet, von denen 3 (0,5%) positiv reagierten. Eine entsprechende Exposition konnte nur bei einem dieser Patienten festgestellt werden. Alle 3 Tetraethylenpentamin-positiven Patienten reagierten auch auf DGEBA-Harz.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich insofern eine Änderung der Bewertung, als nunmehr auch umfangreichere Daten aus dem FIOH vorliegen. Insgesamt kann man jetzt davon ausgehen, dass Sensibilisierungen gegen Tetraethylenpentamin selten sind.

3.3.8 Pentaethylenhexamin, CAS Nr. 004067-16-7

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.3.9 Polyethylenpolyamin, CAS Nr. 068131-73-7

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.3.10 Polyethylenamine, CAS Nr. 026336-38-9

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.3.11 N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin, CAS Nr. 002372-82-9

N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin wird in Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe nur sehr selten eingesetzt. Nach Informationen von GISBAU wurde N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin in nur 4 Sicherheitsdatenblättern gefunden, davon 3 aus den Jahren 2006-2011. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter [Kersting 2011].

N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin ist nicht nur in Epoxidharzsystemen, sondern auch in Flächendesinfektionsmitteln enthalten.

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Bisher wurden vier Fälle von Kontaktallergie gegen N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin bei Krankenhausangestellten beschrieben, darunter auch Fälle mit aerogenem allergischem Kontaktekzem [Dejobert et al. 1997; Dibo und Brasch 2001; Schliemann et al. 2010]. Da recht unterschiedliche Testkonzentrationen verwendet wurden, und keine Testzubereitung für den Epikutantest mit N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin kommerziell angeboten wird, gestaltet sich die Diagnostik schwierig. Möglicher Weise werden entsprechende Sensibilisierungen zu selten diagnostiziert.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Sensibilisierungen gegen N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin wurden in Einzelfällen beobachtet, allerdings nicht durch die Exposition in Epoxidharzsystemen, sondern durch den Kontakt mit Flächendesinfektionsmitteln.

3.3.12 2,2,4-Trimethylhexan-1,6-diamin, CAS Nr. 025513-64-8

Diese CAS-Nummer bezeichnet ebenso wie die unter 3.3.4 genannte CAS Nr. 25620-58-0 das Isomerengemisch aus 2,2,4-Trimethylhexan-1,6-diamin (CAS Nr. 3236-53-1) und 2,4,4-Trimethylhexan-1,6-diamin (CAS Nr. 3236-54-2).

Untersuchungen zur Sensibilisierung gegen Trimethylhexan-1,6-diamin wurden grundsätzlich nur mit dem Isomerengemisch, und nicht etwa mit einem der beiden Isomere in Reinform, durchgeführt. Die entsprechende Literatur ist unter Punkt 3.3.4 referiert.

3.4 Härter, cycloaliphatische Amine

3.4.1 4,4'-Diaminocyclohexylmethan, CAS Nr. 001761-71-3

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

Beim Menschen wurden Sensibilisierungen gegen 4,4'-Diaminocyclohexylmethan nur vereinzelt beobachtet. Die Substanz ist wahrscheinlich nur gering in Epoxidharzsystemen verbreitet und wurde allergologisch bisher kaum untersucht.

Dicyclohexylmethan-4,4'-diisocyanat kann bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit, wie es auf der Haut gegeben ist, zu 4,4'-Diaminocyclohexylmethan reagieren. Daher ist bei Exposition gegenüber Dicyclohexylmethan-4,4'-diisocyanat immer auch eine Exposition gegenüber 4,4'-Diaminocyclohexylmethan gegeben, die zu einer entsprechenden Sensibilisierung führen kann.

3.4.2 Bis(4-(1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethylamino)-3-methylcyclohexyl)methan, CAS Nr. 136210-32-7

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.4.3 N-Aminoethylpiperazin, CAS Nr. 000140-31-8

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

N-Aminoethylpiperazin ist in Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe offenbar weit verbreitet. Nach Informationen von GISBAU wurde N-Aminoethylpiperazin in 160 Sicherheitsdatenblättern gefunden, davon 28 aus den Jahren 2006-2011. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen veröffentlichten 2014 eine retrospektive Analyse von Daten des FIOH über die dort in den Jahren 1991 bis 2013 beobachteten Sensibilisierungen gegen Härter in Epoxidharzsystemen [Aalto-Korte et al. 2014a]. Dort wurde N-Aminoethylpiperazin 0,25% Vas. seit Mai 2006 bei 183 Patienten epikutan getestet, wobei keine positiven Reaktionen beobachtet wurden.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich insofern eine Änderung der Bewertung, als nunmehr auch umfangreichere Daten aus dem FIOH vorliegen. Insgesamt kann man jetzt davon ausgehen, dass Sensibilisierungen gegen N-Aminoethylpiperazin selten sind.

3.4.4 Isophorondiamin, CAS Nr. 002855-13-2

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Isophorondiamin ist in Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe sehr weit verbreitet. Nach Informationen von GISBAU wurde Isophorondiamin in 1009 Sicherheitsdatenblättern genannt, davon 165 aus den Jahren 2006-2011. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Teile der Ergebnisse der IVDK-Datenanalyse, die im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 vorgenommen wurden, wurden 2016 veröffentlicht [Geier et al. 2016 a und b]. In den Jahren 2002 – 2011 lag in den dem IVDK angeschlossenen dermatologischen Abteilungen die Quote von Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% Vas.) bei 1,6% (1.453 von 93.406 Getesteten). Etwa die Hälfte der getesteten Betroffenen war auch gegen einen Reaktivverdünner oder einen Härter sensibilisiert. Unter den (bei 290 – 580 Epoxidharz-positiven Patienten) getesteten Härttern war m-Xylidendiamin das häufigste Allergen (18%), gefolgt von Isophorondiamin (10%), Trimethylhexamethyldiamin (5%), Diethylentriamin (4%) und Triethylentetramin (2%). Härter und Reaktivverdünner wurden nicht nur bei Patienten mit Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz getestet, sondern auch bei (2.800 – 12.800) Epoxidharz-negativen Patienten, wobei sich Reaktionsquoten von 0,1 – 0,9% ergaben. Anders herum betrachtet traten 16 – 62,5% der Sensibilisierungen gegen Härter und 7 – 22% der Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz auf. Um die unterschiedlichen Reaktionshäufigkeiten auf die einzelnen Härter zu der – unbekannt – Zahl der Exponierten in Beziehung zu setzen, wurde hilfsweise als Maß der beruflichen Verbreitung der Härter in Produkten für das Baugewerbe die Häufigkeit der Nennung des jeweiligen Härters in Sicherheitsdatenblättern genommen, die bei GISBAU vorliegen. Aus der Sensibilisierungsfrequenz und der Häufigkeit der Nennungen in den Sicherheitsdatenblättern wurde ein Quotient gebildet. Anhand dieses Quotienten ergab sich folgendes Ranking der „expositionbezogenen Sensibilisierungshäufigkeit“: m-Xylidendiamin > Diethylentriamin > Trimethylhexamethyldiamin > Isophorondiamin > Triethylentetramin. m-Xylidendiamin

erwies sich somit als das stärkste Allergen, während die Häufigkeit der Sensibilisierungen gegen Isophorondiamin wohl eher durch dessen große Verbreitung als durch die hohe sensibilisierende Wirkstärke bedingt ist.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen veröffentlichten 2014 eine retrospektive Analyse von Daten des FIOH über die dort in den Jahren 1991 bis 2013 beobachteten Sensibilisierungen gegen Härter in Epoxidharzsystemen [Aalto-Korte et al. 2014a]. Isophorondiamin war das dritthäufigste Allergen in diesem Bereich. Von August 1992 bis März 1998 wurde Isophorondiamin 0,1% Vas. bei 174 Patienten epikutan getestet, von denen 2 (1,1%) allergisch reagierten. Ab März 1998 wurde die Testkonzentration auf 0,5% Vas. erhöht. Damit wurden bei 10 von 471 Getesteten (2,1%) allergische Reaktionen beobachtet. 8 der insgesamt 12 betroffenen Patienten waren Maler und Lackierer. In 7 Fällen war Isophorondiamin in den beruflich verwendeten Produkten enthalten. In einem Fall wurde vermutet, dass die Reaktion auf Isophorondiamin eine Sensibilisierung gegen das korrespondierende Isocyanat, also Isophorondiisocyanat, anzeigte.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung. Isophorondiamin wird in Epoxidharzsystemen für den Bau-Bereich sehr häufig eingesetzt. Es existieren zahlreiche Einzelfallberichte über Kontaktallergie gegen Isophorondiamin, einschließlich airborne dermatitis. In Reihenuntersuchungen an Patienten mit Verdacht auf Epoxidharz-Allergie stellt Isophorondiamin eines der häufigeren Allergene untern der Härten dar.

3.4.5 3-Cyclohexylaminopropylamin, CAS Nr. 003312-60-5

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.4.6 1,2-Diaminocyclohexan, CAS Nr. 000694-83-7

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

1,2-Diaminocyclohexan ist in Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe offenbar wenig verbreitet. Nach Informationen von GISBAU wurde 1,2-Diaminocyclohexan in 69 Sicherheitsdatenblättern gefunden, davon 7 aus den Jahren 2006-2011. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

1,2-Diaminocyclohexan ist bisher beim Menschen kaum allergologisch untersucht worden.

3.4.7 1,3-Cyclohexylen-bis(methylamin), CAS Nr. 002579-20-6

1,3-Cyclohexylen-bis(methylamin) ist in Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe offenbar nur sehr gering verbreitet. Nach Informationen von GISBAU wurde 1,3-Cyclohexylen-bis(methylamin) in nur 4 Sicherheitsdatenblättern gefunden, davon 3 aus den Jahren 2006-2011. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt.

3.5 Härter, sonstige

3.5.1 m-Xylidendiamin, CAS Nr. 001477-55-0

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

m-Xylidendiamin wird in Epoxidharz-Produkten für das Baugewerbe sehr häufig eingesetzt. Nach Informationen von GISBAU findet sich m-Xylidendiamin in 608 Sicherheitsdatenblättern, davon wurden 122 in den Jahren 2006-2011 erstellt. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Teile der Ergebnisse der IVDK-Datenanalyse, die im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 vorgenommen wurden, wurden 2016 veröffentlicht [Geier et al. 2016 a und b]. In den Jahren 2002 – 2011 lag in den dem IVDK angeschlossenen dermatologischen Abteilungen die Quote von Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% Vas.) bei 1,6% (1.453 von 93.406 Getesteten). Etwa die Hälfte der getesteten Betroffenen war auch gegen einen Reaktivverdünner oder einen Härter sensibilisiert. Unter den (bei 290 – 580 Epoxidharz-positiven Patienten) getesteten Härtern war m-Xylidendiamin das häufigste Allergen (18%), gefolgt von Isophorondiamin (10%), Trimethylhexamethylen-diamin (5%), Diethylentriamin (4%) und Triethyltetramin (2%). Härter und Reaktivverdünner wurden nicht nur bei Patienten mit Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz getestet, sondern auch bei (2.800 – 12.800) Epoxidharz-negativen Patienten, wobei sich Reaktionsquoten von 0,1 – 0,9% ergaben. Anders herum betrachtet traten 16 – 62,5% der Sensibilisierungen gegen Härter und 7 – 22% der Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz auf. Um die unterschiedlichen Reaktionshäufigkeiten auf die einzelnen Härter zu der – unbekannt – Zahl der Exponierten in Beziehung zu setzen, wurde hilfsweise als Maß der beruflichen Verbreitung der Härter in Produkten für das Baugewerbe die Häufigkeit der Nennung des jeweiligen Härters in Sicherheitsdatenblättern genommen, die bei GISBAU vorliegen. Aus der Sensibilisierungsfrequenz und der Häufigkeit der Nennungen in den Sicherheitsdatenblättern wurde ein Quotient gebildet. Anhand dieses Quotienten ergab sich folgendes Ranking der „expositionsbezogenen Sensibilisierungshäufigkeit“: m-Xylidendiamin > Diethylentriamin >

Trimethylhexamethyldiamin > Isophorondiamin > Triethylentetramin. m-Xylidendiamin erwies sich somit als das stärkste Allergen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen veröffentlichten 2014 eine retrospektive Analyse von Daten des FIOH über die dort in den Jahren 1991 bis 2013 beobachteten Sensibilisierungen gegen Härter in Epoxidharzsystemen [Aalto-Korte et al. 2014a]. Dabei erwies sich m-Xylidendiamin als das häufigste Allergen in diesem Bereich. Von November 1995 bis Mai 2006 wurde m-Xylidendiamin 0,1% Vas. bei 362 Patienten epikutan getestet, von denen 11 (3%) allergisch reagierten. Ab Mai 2006 wurde die Testkonzentration auf 0,32% Vas. erhöht. Damit wurden bei 11 von 183 Getesteten (6%) allergische Reaktionen beobachtet. 15 der 22 betroffenen Patienten waren Maler und Lackierer, Oberflächenbeschichter oder Arbeiter in einer Farbenfabrik. Nur 13 gegen m-Xylidendiamin sensibilisierte Patienten waren auch allergisch auf DGEBA-Harz; in 6 Fällen war die Sensibilisierung gegen m-Xylidendiamin die einzige Ursache des durch Epoxidharze ausgelösten Ekzems.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Kawamoto und Kollegen untersuchten 20 Beschäftigte einer Firma, die Gebäudfundamente mit Epoxidharzen repariert [Kawamoto et al. 2015]. Alle hatten Umgang mit einem neuen Produkt, und 11 von Ihnen litten an einem Ekzem. Das Produkt enthielt DGEBA, m-Xylidendiamin und Butylglycidylether. Es wurde spezifisches Immunglobulin G und E gegen DGEBA, m-Xylidendiamin, Butylglycidylether und das Produkt bestimmt. Spezifisches IgE wurde in keinem Fall nachgewiesen. Alle 11 Ekzem-Patienten hatten spezifisches IgG gegen das Produkt, 3 von ihnen auch gegen DGEBA, und jeweils 1 gegen m-Xylidendiamin bzw. Butylglycidylether. Von den 9 Exponierten ohne Ekzem hatten 5 spezifisches IgG gegen das Produkt, aber keiner gegen eine der 3 genannten Komponenten. Die Autoren schlossen aus diesem Ergebnis, dass der Nachweis von spezifischem IgG nicht nur als Expositionsmarker dienen kann, sondern auch als Hinweis auf die Ursache eines Ekzems.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung. m-Xylidendiamin ist in Epoxidharz-Produkten für das Baugewerbe weit verbreitet. Unter den Härtern ist m-Xylidendiamin das häufigste Allergen, wie Studien aus Finnland und Deutschland zeigen.

3.5.2 m-Xylylendiamin/Acrylnitril Adduct, CAS Nr. 73050-11-0

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.5.3 N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan, CAS Nr. 001760-24-3

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.5.4 Polyoxyalkylenamin, CAS Nr. 002997-01-5

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen (auch als 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan bekannt) wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.5.5 3-Aminopropyltriethoxysilan, CAS Nr. 000919-30-2

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt.

3.5.6 Oligomerisierter Härter: 4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin, CAS Nr. 038294-64-3

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt.

3.5.7 Formaldehyd, Polymer mit Benzenamin, hydriert, CAS Nr. 135108-88-2

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt.

3.5.8 Polyethylenpoly-, triethylentetramin, CAS Nr. 090640-46-3

Weder unter der Bezeichnung „Polyethylenpoly-, triethylentetramin“ noch unter der CAS Nr. 90640-46-3 wurden Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden.

Unter der CAS Nr. 90640-46-3 wurde allerdings ausschließlich die Substanz „Amines, N-C₁₂₋₁₈-alkyltrimethylenedi-, diacetates“ und nicht „Polyethylenpoly-, triethylentetramin“ gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt.

3.6 Dicarbonsäureanhydride

3.6.1 Phthalsäureanhydrid, CAS Nr. 000085-44-9

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Säureanhydride wie Phthalsäureanhydrid oder dessen Derivate werden als Härter in heißhärtenden Epoxidharzsystemen eingesetzt. Sie finden daher vorwiegend im Bau von Transformatoren, elektrischen Geräten usw. Verwendung, und nicht im Baugewerbe. Phthalsäureanhydrid und dessen Derivate sind als Auslöser von beruflich bedingtem Asthma bronchiale bekannt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

Phthalsäureanhydrid und dessen Derivate sind als Auslöser von beruflich bedingtem Asthma bronchiale bekannt. Berichte über Sensibilisierungen, die sich klinisch an der Haut manifestieren sind selten; eine Kontakturtikaria wurde in Einzelfällen beschrieben.

3.6.2 Tetrahydrophthalsäureanhydrid, CAS Nr. 000085-43-8

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Säureanhydride wie Phthalsäureanhydrid oder dessen Derivate werden als Härter in heißhärtenden Epoxidharzsystemen eingesetzt. Sie finden daher vorwiegend im Bau von Transformatoren, elektrischen Geräten usw. Verwendung, und nicht im Baugewerbe. Phthalsäureanhydrid und dessen Derivate sind als Auslöser von beruflich bedingtem Asthma bronchiale bekannt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.6.3 Hexahydrophthalsäureanhydrid, CAS Nr. 000085-42-7

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Säureanhydride wie Phthalsäureanhydrid oder dessen Derivate werden als Härter in heißhärtenden Epoxidharzsystemen eingesetzt. Sie finden daher vorwiegend im Bau von Transformatoren, elektrischen Geräten usw. Verwendung, und nicht im Baugewerbe. Phthalsäureanhydrid und dessen Derivate sind als Auslöser von beruflich bedingtem Asthma bronchiale bekannt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung. Phthalsäureanhydrid und dessen Derivate sind als Auslöser von beruflich bedingtem Asthma bronchiale bekannt. Berichte über Sensibilisierungen, die sich klinisch an der Haut manifestieren sind selten; eine Kontakturtikaria wurde in Einzelfällen beschrieben.

3.6.4 Methyltetrahydrophthalsäureanhydrid, CAS Nr. 011070-44-3

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Säureanhydride wie Phthalsäureanhydrid oder dessen Derivate werden als Härter in heißhärtenden Epoxidharzsystemen eingesetzt. Sie finden daher vorwiegend im Bau von Transformatoren, elektrischen Geräten usw. Verwendung, und nicht im Baugewerbe. Phthalsäureanhydrid und dessen Derivate sind als Auslöser von beruflich bedingtem Asthma bronchiale bekannt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung. Phthalsäureanhydrid und dessen Derivate sind als Auslöser von beruflich bedingtem Asthma bronchiale bekannt. Berichte über Sensibilisierungen, die sich klinisch an der Haut manifestieren sind selten; eine Kontakturtikaria wurde in Einzelfällen beschrieben.

3.6.5 Methylhexahydrophthalsäureanhydrid, CAS Nr. 025550-51-0

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Säureanhydride wie Phthalsäureanhydrid oder dessen Derivate werden als Härter in heißhärtenden Epoxidharzsystemen eingesetzt. Sie finden daher vorwiegend im Bau von Transformatoren, elektrischen Geräten usw. Verwendung, und nicht im Baugewerbe. Phthalsäureanhydrid und dessen Derivate sind als Auslöser von beruflich bedingtem Asthma bronchiale bekannt.

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen veröffentlichten 2014 eine retrospektive Analyse von Daten des FIOH über die dort in den Jahren 1991 bis 2013 beobachteten Sensibilisierungen gegen Härter in Epoxidharzsystemen [Aalto-Korte et al. 2014a]. Dort wurde Methylhexahydrophthalsäureanhydrid 1% Vas. bei 469 Patienten epikutan getestet, wobei keine positiven Reaktionen beobachtet wurden.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.
Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.
Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich insofern eine Änderung der Bewertung, als nunmehr auch umfangreichere Daten aus dem FIOH vorliegen. Insgesamt kann man jetzt davon ausgehen, dass Sensibilisierungen gegen Methylhexahydrophthalsäureanhydrid selten sind. Phthalsäureanhydrid und dessen Derivate sind als Auslöser von beruflich bedingtem Asthma bronchiale bekannt. Berichte über Sensibilisierungen, die sich klinisch an der Haut manifestieren sind selten; eine Kontakturtikaria wurde in Einzelfällen beschrieben, wobei Berichte über entsprechende Erkrankungen durch Methylhexahydrophthalsäureanhydrid etwas häufiger sind als Berichte, in denen andere Derivate des Phthalsäureanhydrids als Auslöser genannt werden.

3.7 Sekundäre und tertiäre Amine

3.7.1 3-((6-Aminotrimethylhexyl)amino)propionitril, CAS Nr. 093941-62-9

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.7.2 N,N-Dimethyl-cyclohexanamin, CAS Nr. 000098-94-2

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt.

3.8 Phenole

3.8.1 p-tert-Butylphenol, CAS Nr. 000098-54-4

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

p-tert-Butylphenol ist in Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe offenbar weit verbreitet. Nach Informationen von GISBAU wurde die Verbindung in 171 Sicherheitsdatenblättern gefunden, davon 32 aus den Jahren 2006-2011. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass p-tert-Butylphenol ein eher seltenes Allergen ist.

3.8.2 Bisphenol A, CAS Nr. 000080-05-7

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

In Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe scheint Bisphenol A nur wenig verbreitet zu sein. Bei GISBAU liegen 73 Sicherheitsdatenblätter vor, in denen Bisphenol A als Bestandteil genannt ist, davon wurden 22 nach 2005 erstellt. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

In Reihentestungen erwies sich Bisphenol A als seltenes Allergen. In Einzelfällen wurde eine klinisch relevante Kontaktallergie gegen Bisphenol A nachgewiesen, wobei nicht nur Epoxidharze im Stadium der Produktion oder der Verarbeitung die Allergenquelle darstellten. Auch andere Expositionen, z.B. das Tragen von PVC-Handschuhen, in denen Bisphenol A als Antioxidans enthalten war, wurden als Sensibilisierungsquellen genannt. Schließlich gibt es offenbar immunologische Kreuzreaktionen bei primärer Sensibilisierung gegen Diethylstilbestrol oder chemisch verwandte Stoffe, die zu einer Kontaktallergie gegen Bisphenol A führen können.

3.8.3 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol, CAS Nr. 000090-72-2

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol wird in Epoxidharz-Produkten für das Baugewerbe häufig eingesetzt. Nach Informationen von GISBAU findet sich 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol in 348 Sicherheitsdatenblättern, davon wurden 81 in den Jahren 2006-2011 erstellt. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen veröffentlichten 2014 eine retrospektive Analyse von Daten des FIOH über die dort in den Jahren 1991 bis 2013 beobachteten Sensibilisierungen gegen Härter von Epoxidharzsystemen [Aalto-Korte et al. 2014a]. Dabei erwies sich 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol als das zweithäufigste Allergen in diesem Bereich. Von Januar 1991 bis Mai 2006 wurde 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol 0,1% Vas. bei 485 Patienten epikutan getestet, von denen 9 (1,9%) allergisch reagierten. Ab Mai 2006 wurde die Testkonzentration auf 0,32% Vas. erhöht. Damit wurden bei 4 von 183 Getesteten (2,2%) allergische Reaktionen beobachtet. 10 der insgesamt 13 betroffenen Patienten waren Maler und Lackierer. 11 gegen 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol sensibilisierte Patienten waren auch allergisch auf DGEBA-Harz.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Ein 48jähriger gegenüber Epoxidharzsystemen exponierter Parkettleger erkrankte an einem arbeitsabhängigen aerogenen allergischen Kontaktekzem. Im Epikutantest reagierte er auf DGEBA-Harz (1% Vas.) und 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (1% Vas.). In der Härterkomponente des am dringendsten als Auslöser verdächtigten Produktes waren neben 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol auch Triethylentetramin, N-Aminoethylpiperazin und Benzylalkohol enthalten, auf die der Patient im Epikutantest jedoch nicht reagierte [Geier et al. 2012].

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich eine Änderung der Bewertung. Aufgrund der umfangreichen seriellen Testungen im FIOH, bei denen sich 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol als das zweithäufigste Allergen unter den Härtern bzw. Beschleunigern für Epoxidharzsysteme erwies, kann man nunmehr die Einschätzung angeben, dass 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol als „häufiges“ Allergen anzusehen ist.

3.8.4 Bis[(dimethylamino)methyl]phenol, CAS Nr. 071074-89-0

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt.

3.9 Reaktivverdünner

3.9.1 Butylglycidylether, CAS Nr. 002426-08-6

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Butylglycidylether wird nach Informationen von GISBAU in Epoxidharzsystemen in der Bauwirtschaft nicht eingesetzt [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen haben 2015 eine retrospektive Analyse der Fälle von Kontaktallergie gegen Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen publiziert, die im FIOH in den Jahren 1991 – 2014 beobachtet wurden [Aalto-Korte et al. 2015]. Butylglycidylether (0,25% Vas.) wurde bei 325 Patienten epikutan getestet, von denen 3 (0,9%) allergisch reagierten. Bemerkenswert ist, dass es keine Produkte auf dem finnischen Markt gab (und gibt), die Butylglycidylether enthielten. Zwei der 3 Patienten mit positiver Reaktion auf Butylglycidylether reagierten auch positiv auf 1,4-Butandioldiglycidylether; bei dem dritten Patienten wurde 1,4-Butandioldiglycidylether nicht getestet.

Teile der Ergebnisse der IVDK-Datenanalyse, die im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 vorgenommen wurden, wurden 2016 veröffentlicht [Geier et al. 2016 a und b]. In den Jahren 2002 – 2011 lag in den dem IVDK angeschlossenen dermatologischen Abteilungen die Quote von Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% Vas.) bei 1,6% (1.453 von 93.406 Getesteten). Etwa die Hälfte der getesteten Betroffenen war auch gegen einen Reaktivverdünner oder einen Härter sensibilisiert. Unter den (bei 340 – 615 Epoxidharz-positiven Patienten) getesteten Reaktivverdünnern war 1,6-Hexandioldiglycidylether das häufigste Allergen (42%), gefolgt von 1,4-Butandioldiglycidylether (34%), Phenylglycidylether (29%), p-tert-Butylphenylglycidylether (27%), Kresylglycidylether (15%), Butylglycidylether (11%) und Trimethylolpropan-triglycidylether (8%). Härter und Reaktivverdünner wurden nicht nur bei Patienten mit Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz getestet, sondern auch bei (2.800 – 12.800) Epoxidharz-negativen Patienten, wobei sich Reaktionsquoten von 0,1 – 0,9% ergaben. Anders herum betrachtet traten 16 – 62,5% der Sensibilisierungen gegen Härter und 7 – 22% der Sensibilisierungen

gegen Reaktivverdünner ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz auf. Bemerkenswerter Weise reagierten 83% der gegen Butylglycidylether sensibilisierten Patienten auch auf 1,4-Butandioldiglycidylether (umgekehrt: 26%), was zu der Annahme führte, dass möglicher Weise ein Abbauprodukt von 1,4-Butandioldiglycidylether für diese Form von Kreuzreaktionen verantwortlich ist, und sich daher auch die vergleichsweise hohe Reaktionsfrequenz auf den recht selten in Epoxidharzsystemen eingesetzten Butylglycidylether erklärt.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Kawamoto und Kollegen untersuchten 20 Beschäftigte einer Firma, die Gebäudefundamente mit Epoxidharzen repariert [Kawamoto et al. 2015]. Alle hatten Umgang mit einem neuen Produkt, und 11 von Ihnen litten an einem Ekzem. Das Produkt enthielt DGEBA, m-Xylidendiamin und Butylglycidylether. Es wurde spezifisches Immunglobulin G und E gegen DGEBA, m-Xylidendiamin, Butylglycidylether und das Produkt bestimmt. Spezifisches IgE wurde in keinem Fall nachgewiesen. Alle 11 Ekzem-Patienten hatten spezifisches IgG gegen das Produkt, 3 von ihnen auch gegen DGEBA, und jeweils 1 gegen m-Xylidendiamin bzw. Butylglycidylether. Von den 9 Exponierten ohne Ekzem hatten 5 spezifisches IgG gegen das Produkt, aber keiner gegen eine der 3 genannten Komponenten. Die Autoren schlossen aus diesem Ergebnis, dass der Nachweis von spezifischem IgG nicht nur als Expositionsmarker dienen kann, sondern auch als Hinweis auf die Ursache eines Ekzems.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung. Allergische Reaktionen auf Butylglycidylether werden bei Patienten mit Verdacht auf Epoxidharz-Allergie mäßig häufig beobachtet. Möglicher Weise entstehen allergische Reaktionen gegen Butylglycidylether auf dem Boden einer immunologischen Kreuzreaktion bei primärer Sensibilisierung gegen 1,4-Butandioldiglycidylether.

3.9.2 1,4-Butandiol diglycidylether, CAS Nr. 002425-79-8

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Im Baugewerbe wird 1,4-Butandiol diglycidylether offenbar nur selten als Härter in Epoxidharzsystemen eingesetzt. Nach Informationen von GISBAU findet sich 1,4-Butandiol diglycidylether 29 Sicherheitsdatenblättern, davon wurden 11 in den Jahren 2006 bis 2011 erstellt. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen haben 2015 eine retrospektive Analyse der Fälle von Kontaktallergie gegen Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen publiziert, die im FIOH in den Jahren 1991 – 2014 beobachtet wurden [Aalto-Korte et al. 2015]. 1,4-Butandiol diglycidylether (0,25% Vas.) wurde in dieser Zeit bei insgesamt 720 Patienten epikutan getestet, von denen 35 (4,9%) allergisch reagierten. Unter den Patienten ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz war 1,4-Butandiol diglycidylether der am häufigsten sensibilisierende Reaktivverdünner (keine näheren Angaben), und in 3 Fällen war die Sensibilisierung gegen 1,4-Butandiol diglycidylether die einzige Ursache des beruflich bedingten allergischen Kontaktekzems. Bei 12 der 35 Patienten mit allergischer Reaktion auf 1,4-Butandiol diglycidylether (u.a. Fliesenleger, Modellbauer, Arbeiter in der Elektroindustrie) war 1,4-Butandiol diglycidylether in den am Arbeitsplatz verwendeten Epoxidharzprodukten enthalten. Auf dem finnischen Markt ist dieser Reaktivverdünner mäßig weit verbreitet. In dem entsprechenden Produktregister sind 44 Epoxidharzprodukte genannt, die 1,4-Butandiol diglycidylether enthalten.

Teile der Ergebnisse der IVDK-Datenanalyse, die im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 vorgenommen wurden, wurden 2016 veröffentlicht [Geier et al. 2016 a und b]. In den Jahren 2002 – 2011 lag in den dem IVDK angeschlossenen dermatologischen Abteilungen die Quote von Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% Vas.) bei 1,6% (1.453 von 93.406 Getesteten). Etwa die Hälfte der getesteten Betroffenen war auch gegen einen Reaktivverdünner oder einen Härter sensibilisiert. Unter den (bei 340 – 615 Epoxidharz-positiven Patienten) getesteten Reaktivverdünnern war

1,6-Hexandioldiglycidylether das häufigste Allergen (42%), gefolgt von 1,4-Butandioldiglycidylether (34%), Phenylglycidylether (29%), p-tert-Butylphenylglycidylether (27%), Kresylglycidylether (15%), Butylglycidylether (11%) und Trimethylolpropan-triglycidylether (8%). Härter und Reaktivverdünner wurden nicht nur bei Patienten mit Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz getestet, sondern auch bei (2.800 – 12.800) Epoxidharz-negativen Patienten, wobei sich Reaktionsquoten von 0,1 – 0,9% ergaben. Anders herum betrachtet traten 16 – 62,5% der Sensibilisierungen gegen Härter und 7 – 22% der Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz auf. Etwa 93% der Patienten mit Reaktion auf 1,4-Butandioldiglycidylether reagierten auch allergisch auf 1,6-Hexandioldiglycidylether; in umgekehrter Richtung waren es 75%. Bemerkenswerter Weise reagierten 83% der gegen Butylglycidylether sensibilisierten Patienten auch auf 1,4-Butandioldiglycidylether (umgekehrt: 26%), was zu der Annahme führte, dass möglicherweise ein Abbauprodukt von 1,4-Butandioldiglycidylether für diese Form von Kreuzreaktionen verantwortlich ist, und sich daher auch die relativ hohe Reaktionsfrequenz auf den vergleichsweise selten in Epoxidharzsystemen eingesetzte Butylglycidylether erklärt.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung; 1,4-Butandioldiglycidylether ist ein häufiges Allergen unter den Reaktivverdünnern. Immunologische Kreuzreaktionen mit 1,6-Hexandioldiglycidylether sind wahrscheinlich.

3.9.3 Neopentylglykol-diglycidylether, CAS Nr. 017557-23-2

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Neopentylglykol-diglycidylether hat in Epoxidharzsystemen für die Bauwirtschaft offenbar nur eine geringe Verbreitung. Nach Informationen von GISBAU findet sich Neopentylglykol-diglycidylether in 26 Sicherheitsdatenblättern, davon wurde 1 in den Jahren 2006 bis 2011 erstellt. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

Da keine standardisierte Epikutantestsubstanz kommerziell erhältlich ist, wird Neopentylglykol-diglycidylether kaum getestet.

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen haben 2015 eine retrospektive Analyse der Fälle von Kontaktallergie gegen Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen publiziert, die im FIOH in den Jahren 1991 – 2014 beobachtet wurden [Aalto-Korte et al. 2015]. Neopentylglykol-diglycidylether wurde nur zu Beginn des Untersuchungszeitraumes in einer Konzentration von 0,25% Vas. bei insgesamt 39 Patienten epikutan getestet, von denen 1 (2,6%) allergisch reagierte. Der Patient reagierte außerdem auf 1,4-Butandioldiglycidylether und Diethylenglycoldiglycidylether (CAS 4206-61-5). Neopentylglykol-diglycidylether war in seinen am Arbeitsplatz verwendeten Epoxidharzprodukten nicht enthalten. Überhaupt ist Neopentylglykol-diglycidylether auf dem finnischen Markt nicht weit verbreitet. In dem entsprechenden Produktregister sind nur 5 Epoxidharzprodukte genannt, die Neopentylglykol-diglycidylether enthalten.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.
Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

Aufgrund der geringen Verbreitung von Neopentylglykol-diglycidylether und der Nicht-Verfügbarkeit einer standardisierten Testsubstanz liegen zu wenige Informationen zu dessen sensibilisierender Wirkung beim Menschen vor.

3.9.4 2-Ethylhexylglycidylether, CAS Nr. 002461-15-6

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.9.5 1,6-Hexandioldiglycidylether, CAS Nr. 016096-31-4

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Im Baugewerbe wird 1,6-Hexandioldiglycidylether weit verbreitet als Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen eingesetzt. Nach Informationen von GISBAU findet sich 1,6-Hexandioldiglycidylether in 321 Sicherheitsdatenblättern, davon wurden 63 in den Jahren 2006 bis 2011 erstellt. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen haben 2015 eine retrospektive Analyse der Fälle von Kontaktallergie gegen Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen publiziert, die im FIOH in den Jahren 1991 – 2014 beobachtet wurden [Aalto-Korte et al. 2015]. 1,6-Hexandioldiglycidylether wurde nur zu Beginn des Untersuchungszeitraumes in einer Konzentration von 0,25% Vas. bei insgesamt 39 Patienten epikutan getestet, von denen 2 (5,1%) allergisch reagierten. Beide Patienten reagierten auch auf 1,4-Butandioldiglycidylether; in ihren am Arbeitsplatz verwendeten Epoxidharzprodukten war 1,6-Hexandioldiglycidylether nicht enthalten. Auf dem finnischen Markt ist 1,6-Hexandioldiglycidylether ähnlich weit verbreitet wie 1,4-Butandioldiglycidylether. In dem entsprechenden Produktregister sind 50 Epoxidharzprodukte genannt, die 1,6-Hexandioldiglycidylether enthalten.

Teile der Ergebnisse der IVDK-Datenanalyse, die im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 vorgenommen wurden, wurden 2016 veröffentlicht [Geier et al. 2016 a und b]. In den Jahren 2002 – 2011 lag in den dem IVDK angeschlossenen dermatologischen Abteilungen die Quote von Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% Vas.) bei 1,6% (1.453 von 93.406 Getesteten). Etwa die Hälfte der getesteten Betroffenen war auch gegen einen Reaktivverdünner oder einen Härter sensibilisiert. Unter den (bei 340 – 615 Epoxidharz-positiven Patienten) getesteten Reaktivverdünnern war 1,6-Hexandioldiglycidylether das häufigste Allergen (42%), gefolgt von 1,4-Butandioldiglycidylether (34%), Phenylglycidylether (29%), p-tert-Butylphenylglycidylether (27%), Kresylglycidylether (15%), Butylglycidylether (11%) und Trimethylolpropan-triglycidylether (8%). Härter und Reaktivverdünner wurden nicht nur bei Patienten mit Sensibilisierung

gegen DGEBA-Harz getestet, sondern auch bei (2.800 – 12.800) Epoxidharz-negativen Patienten, wobei sich Reaktionsquoten von 0,1 – 0,9% ergaben. Anders herum betrachtet traten 16 – 62,5% der Sensibilisierungen gegen Härter und 7 – 22% der Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz auf. Etwa 75% der Patienten mit Reaktion auf 1,6-Hexandioldiglycidylether reagierten auch allergisch auf 1,4-Butandioldiglycidylether; in umgekehrter Richtung waren es 93%.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

1,6-Hexandioldiglycidylether ist ein häufiges Allergen unter den Reaktivverdünnern. Das häufige Auftreten gleichzeitiger Sensibilisierungen gegen 1,6-Hexandioldiglycidylether und 1,4-Butandioldiglycidylether dürfte am ehesten auf immunologische Kreuzreaktionen zurückzuführen sein.

3.9.6 Versaticsäureglycidylester (z.B. Cadura E 10), (syn. 2,2'-Dioctyldecansäure-2,3 epoxypropylester), CAS Nr. 026761-45-5

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Im Baugewerbe wird Versaticsäureglycidylester häufig als Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen eingesetzt. Nach Informationen von GISBAU wird die Substanz in 170 Sicherheitsdatenblättern erwähnt, davon wurden 18 in den Jahren 2006-2011 erstellt. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen haben 2015 eine retrospektive Analyse der Fälle von Kontaktallergie gegen Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen publiziert, die im FIOH in den Jahren 1991 – 2014 beobachtet wurden [Aalto-Korte et al. 2015]. Versaticsäureglycidylester (Cadura E 10) wurde bei insgesamt 254 Patienten epikutan getestet, und zwar zunächst bei 39 Patienten in einer Konzentration von 0,25% Vas., später bei 215 Patienten 1% Vas. Positive Reaktionen wurden nach den Angaben in der Tabelle nicht beobachtet; im Text wurde jedoch ein Autolackierer erwähnt, der auf einen verwendeten Lack allergisch reagierte, und der im Epikutantesat sowohl auf den Lack als auch auf Versaticsäureglycidylester 1% Vas. positiv reagierte. Auf dem finnischen Markt ist dieser Reaktivverdünner relativ weit verbreitet: In dem entsprechenden Produktregister sind 99 Epoxidharzprodukte genannt, die diesen Glycidylester enthalten.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.
Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.
Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich insofern eine Änderung der Bewertung, als nunmehr auch umfangreichere Daten aus dem FIOH vorliegen. Insgesamt kann man davon ausgehen, dass Sensibilisierungen gegen Versaticsäureglycidylester selten sind.

3.9.7 Trimethylolpropan-triglycidylether, CAS Nr. 030499-70-8

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Im Baugewerbe wird Trimethylolpropan-triglycidylether nur selten als Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen eingesetzt. Nach Informationen von GISBAU wird die Substanz in 26 Sicherheitsdatenblättern erwähnt, davon wurden 4 in den Jahren 2006-2011 erstellt. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen haben 2015 eine retrospektive Analyse der Fälle von Kontaktallergie gegen Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen publiziert, die im FIOH in den Jahren 1991 – 2014 beobachtet wurden [Aalto-Korte et al. 2015]. Trimethylolpropan-triglycidylether wurde ab Juni 2011 in einer Konzentration von 0,25% Vas. bei insgesamt 79 Patienten epikutan getestet, von denen 1 (1,3%) allergisch reagierte. Der Patient reagierte außerdem auf 1,4-Butandiol-diglycidylether, der – im Gegensatz zu Trimethylolpropan-triglycidylether – in seinen am Arbeitsplatz verwendeten Epoxidharzprodukten enthalten war. Auf dem finnischen Markt ist dieser Reaktivverdünner nicht weit verbreitet: In dem entsprechenden Produktregister sind nur 12 Epoxidharzprodukte genannt, die Trimethylolpropan-triglycidylether enthalten.

Teile der Ergebnisse der IVDK-Datenanalyse, die im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 vorgenommen wurden, wurden 2016 veröffentlicht [Geier et al. 2016 a und b]. In den Jahren 2002 – 2011 lag in den dem IVDK angeschlossenen dermatologischen Abteilungen die Quote von Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% Vas.) bei 1,6% (1.453 von 93.406 Getesteten). Etwa die Hälfte der getesteten Betroffenen war auch gegen einen Reaktivverdünner oder einen Härter sensibilisiert. Unter den (bei 340 – 615 Epoxidharz-positiven Patienten) getesteten Reaktivverdünnern war 1,6-Hexandiol-diglycidylether das häufigste Allergen (42%), gefolgt von 1,4-Butandiol-diglycidylether (34%), Phenylglycidylether (29%) p-tert-Butylphenylglycidylether (27%),

Kresylglycidylether (15%), Butylglycidylether (11%) und Trimethylolpropan-triglycidylether (8%). Die klinische Relevanz der positiven Reaktionen auf Trimethylolpropan-triglycidylether blieb allerdings unklar.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

Die in seriellen Testungen festgestellten Sensibilisierungen gegen Trimethylolpropan-triglycidylether sind oft schwer zu interpretieren, da meist keine Exposition gegen den offenbar insgesamt nur wenig verbreiteten Trimethylolpropan-triglycidylether festgestellt werden kann. In wenigen Einzelfällen wurden klinisch relevante Sensibilisierungen festgestellt.

3.9.8 C12/C14-Monoglycidylether, CAS Nr. 068609-97-2

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Im Baugewerbe wird C12/C14-Monoglycidylether sehr weit verbreitet als Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen eingesetzt. Nach Informationen von GISBAU findet sich C12/C14-Monoglycidylether in 458 Sicherheitsdatenblättern, davon wurden 116 in den Jahren 2006-2011 erstellt. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen haben 2015 eine retrospektive Analyse der Fälle von Kontaktallergie gegen Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen publiziert, die im FIOH in den Jahren 1991 – 2014 beobachtet wurden [Aalto-Korte et al. 2015]. C12/C14-Monoglycidylether (0,25% Vas.) wurde bis 1992 bei 39 Patienten epikutan getestet, wobei keine positiven (allergischen) Reaktionen auftraten. Danach wurden Testungen mit C12/C14-Monoglycidylether gestoppt. Auf dem finnischen Markt ist dieser Reaktivverdünner derjenige, der am häufigsten in Epoxidharzprodukten eingesetzt wird: In dem entsprechenden Produktregister sind 144 Epoxidharzprodukte genannt, die C12/C14-Monoglycidylether enthalten.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

Die Berichte über Sensibilisierungen gegen C12/C14-Alkylglycidylether sind widersprüchlich und nicht einfach zu interpretieren. Die positiven Tierversuche zur Sensibilisierung aus den 1970er Jahren wurden mit Gemischen durchgeführt, deren Reinheit nicht näher angegeben ist. Auch die beim Menschen beobachteten Sensibilisierungen wurden mit einem Reaktiv-Verdünner beobachtet, der "vorwiegend" C12/C14-Alkylglycidylether enthielt. Es ist also durchaus möglich, dass hier Verunreinigungen eine wesentliche Rolle gespielt haben. Bemerkenswert ist, dass trotz der großen Verbreitung von C12/C14-Alkylglycidylether in Epoxidharzsystemen in EPOX 2002 keine allergischen Reaktionen aufgetreten sind. Darüber hinaus wurden keine weiteren allergologischen Untersuchungen mit C12/C14-Alkylglycidylether in größerem Umfang durchgeführt.

3.9.9 Polypropylenglykoldiglycidylether / Polyoxypropylen-diglycidylether **CAS Nr. 026142-30-3**

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.9.10 Polypropyleneglykol (chlormethyl)oxiran Polymer, CAS Nr. 009072-62-2

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Im Baugewerbe wird Polypropylenglykol (chlormethyl)oxiran Polymer (Polypropylenglycoldiglydiylether) nur in geringem Umfang als Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen eingesetzt. Nach Informationen von GISBAU findet sich dieser Glycidylether in 12 Sicherheitsdatenblättern, davon wurden 8 in den Jahren 2006-2011 erstellt. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen haben 2015 eine retrospektive Analyse der Fälle von Kontaktallergie gegen Reaktivverdünner und verwandte aliphatische Epoxidharze publiziert, die im FIOH in den Jahren 1991 – 2014 beobachtet wurden [Aalto-Korte et al. 2015]. Ein Harz mit dieser CAS-Nr. (DER ® 736; Polypropylenglycoldiglydiylether) wurde 0,5% Vas. bei insgesamt 726 Patienten epikutan getestet, von denen 10 positiv reagierten. Eine entsprechende Exposition konnte jedoch bei diesen Patienten nicht festgestellt werden. Auf dem finnischen Markt ist dieses Harz mäßig weit verbreitet: In dem entsprechenden Produktregister sind 19 Epoxidharzprodukte genannt, die DER ® 736 enthalten.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich insofern eine Änderung der Bewertung, als nunmehr umfangreichere Daten aus dem FIOH vorliegen. Insgesamt kann man davon ausgehen, dass Sensibilisierungen gegen Polypropylenglycoldiglydiylether selten sind.

3.9.11 Dipropylenglykol-diglycidylether, CAS Nr. 041638-13-5

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.9.12 Cyclohexandimethanol-diglycidylether, CAS Nr. 014228-73-0 und Cyclohexandimethanol-divinylether, CAS Nr. 017351-75-6

3.9.12.1 Cyclohexandimethanol-diglycidylether, CAS Nr. 014228-73-0

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

Es liegen nach wie vor keine ausreichenden Humandaten vor, um eine Bewertung dieser Substanz vorzunehmen.

3.9.12.2 Cyclohexandimethanol-divinylether, CAS Nr. 017351-75-6

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Entfällt, da auch im Vorgängerprojekt FP-0324 keine entsprechenden Angaben gefunden worden waren.

3.9.13 p-tert-Butylphenylglycidylether, CAS Nr. 003101-60-8

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Im Baugewerbe wird p-tert-Butylphenylglycidylether selten als Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen eingesetzt. Nach Informationen von GISBAU findet sich p-tert-Butylphenylglycidylether in 54 Sicherheitsdatenblättern, davon wurden 16 in den Jahren 2006-2011 erstellt. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen haben 2015 eine retrospektive Analyse der Fälle von Kontaktallergie gegen Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen publiziert, die im FIOH in den Jahren 1991 – 2014 beobachtet wurden [Aalto-Korte et al. 2015]. p-tert-Butylphenylglycidylether (0,25% Vas.) wurde ab Mai 2006 bei 215 Patienten epikutan getestet,

von denen 19 (8,8%) allergisch reagierten. Eine Exposition gegenüber p-tert-Butylphenylglycidylether konnte allerdings in keinem Fall festgestellt werden. Es gab jedoch auf dem finnischen Markt 26 Epoxidharzprodukte, die p-tert-Butylphenylglycidylether enthielten. Parallele Testungen mit Phenylglycidylether (0,25% Vas.) erfolgten bei allen 215 mit p-tert-Butylphenylglycidylether getesteten Patienten. Acht der 19 Patienten, die auf p-tert-Butylphenylglycidylether reagierten, reagierten auch auf Phenylglycidylether.

Teile der Ergebnisse der IVDK-Datenanalyse, die im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 vorgenommen wurden, wurden 2016 veröffentlicht [Geier et al. 2016 a und b]. In den Jahren 2002 – 2011 lag in den dem IVDK angeschlossenen dermatologischen Abteilungen die Quote von Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% Vas.) bei 1,6% (1.453 von 93.406 Getesteten). Etwa die Hälfte der getesteten Betroffenen war auch gegen einen Reaktivverdünner oder einen Härter sensibilisiert. Unter den (bei 340 – 615 Epoxidharz-positiven Patienten) getesteten Reaktivverdünnern war 1,6-Hexandioldiglycidylether das häufigste Allergen (42%), gefolgt von 1,4-Butandioldiglycidylether (34%), Phenylglycidylether (29%) p-tert-Butylphenylglycidylether (27%), Kresylglycidylether (15%), Butylglycidylether (11%) und Trimethylolpropan-triglycidylether

(8%). Unter den aromatischen Glycidylethern gab es Kreuzreaktionen. 95% der gegen Kresylglycidylether sensibilisierten Patienten reagierten auch auf Phenylglycidylether; umgekehrt waren dies 44%. Die Kreuzreaktivität zwischen p-tert-Butylphenylglycidylether und Phenylglycidylether bzw. zwischen p-tert-Butylphenylglycidylether und Kresylglycidylether war nicht im selben Maße ausgeprägt, woraus geschlossen wurde, dass p-tert-Butylphenylglycidylether eher ein eigenständiges Allergen ist.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich insofern Änderung der Bewertung, als jetzt insgesamt mehr Humandaten zur Sensibilisierung gegen p-tert-Butylphenylglycidylether und umfangreichere Analysen zu etwaigen Kreuzreaktionen vorliegen.

Vieles spricht dafür, dass p-tert-Butylphenylglycidylether ein eigenständiges Allergen ist, und Sensibilisierungen gegen p-tert-Butylphenylglycidylether nicht (immer) Ausdruck einer immunologischen Kreuzreaktion bei primärer Sensibilisierung gegen einen anderen Glycidylether sind. Die relativ hohen Sensibilisierungsquoten sprechen vor allem vor dem Hintergrund der offenbar nicht besonders großen Verbreitung von p-tert-Butylphenylglycidylether dafür, dass es sich um ein eher starkes Allergen handelt.

3.9.14 Phenylglycidylether, CAS Nr. 000122-60-1

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Im Baugewerbe wird Phenylglycidylether gar nicht (mehr) als Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen eingesetzt. Nach Informationen von GISBAU ist Phenylglycidylether in keinem der 3.692 erfassten Sicherheitsdatenblätter erwähnt [Kersting 2011].

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen haben 2015 eine retrospektive Analyse der Fälle von Kontaktallergie gegen Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen publiziert, die im FIOH in den Jahren 1991 – 2014 beobachtet wurden [Aalto-Korte et al. 2015]. Phenylglycidylether (0,25% Vas.) wurde bei 830 Patienten epikutan getestet, von denen 41 (4,9%) allergisch reagierten. Bemerkenswert ist, dass es keine Produkte auf dem finnischen Markt gab (und gibt), die Phenylglycidylether enthielten. Auch bei den 41 Patienten mit positiver Reaktion auf Phenylglycidylether konnte keine entsprechende Exposition nachgewiesen werden. Vierzig dieser 41 Patienten waren gegen DGEBA-Harz sensibilisiert, was die Theorie immunologischer Kreuzreaktionen bei primärer Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz [Pontén et al. 2004] stützt. Bei 647 Patienten wurden Phenylglycidylether und Kresylglycidylether (0,25% Vas.) parallel getestet. Davon reagierten insgesamt 30 auf Phenylglycidylether, 16 auf Kresylglycidylether und von diesen 14 auf beide Reaktivverdünner. Es reagierten also 87,5% (14 von 16) der Patienten mit Sensibilisierung gegen Kresylglycidylether auch auf Phenylglycidylether, und in umgekehrter Richtung 46,7% (14 von 30). Parallele Testungen mit Phenylglycidylether und p-tert-Butylphenylglycidylether (0,25% Vas.) erfolgten bei 215 Patienten, von denen 19 auf p-tert-Butylphenylglycidylether reagierten. Von diesen wiederum reagierten 8 auch auf Phenylglycidylether; isolierte positive Reaktionen auf Phenylglycidylether kamen nicht vor.

Teile der Ergebnisse der IVDK-Datenanalyse, die im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 vorgenommen wurden, wurden 2016 veröffentlicht [Geier et al. 2016 a und b]. In den Jahren 2002 – 2011 lag in den dem IVDK angeschlossenen dermatologischen Abteilungen die Quote von Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% Vas.) bei 1,6% (1.453 von 93.406 Getesteten). Etwa die Hälfte der Betroffenen war auch

gegen einen Reaktivverdünner oder einen Härter sensibilisiert. Unter den (bei 340 – 615 Epoxidharz-positiven Patienten) getesteten Reaktivverdünnern war 1,6-Hexandiol-diglycidylether das häufigste Allergen (42%), gefolgt von 1,4-Butandiol-diglycidylether (34%), Phenylglycidylether (29%) p-tert-Butylphenylglycidylether (27%), Kresylglycidylether (15%), Butylglycidylether (11%) und Trimethylolpropan-triglycidylether (8%). Härter und Reaktivverdünner wurden nicht nur bei Patienten mit Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz getestet, sondern auch bei (2.800 – 12.800) Epoxidharz-negativen Patienten, wobei sich Reaktionsquoten von 0,1 – 0,9% ergaben. Anders herum betrachtet traten 16 – 62,5% der Sensibilisierungen gegen Härter und 7 – 22% der Sensibilisierungen gegen Reaktivverdünner ohne Sensibilisierung gegen DGEBA-Harz auf. Unter den aromatischen Glycidylethern gab es Kreuzreaktionen. 95% der gegen Kresylglycidylether sensibilisierten Patienten reagierten auch auf Phenylglycidylether; umgekehrt waren dies 44%. Die Kreuzreaktivität zwischen p-tert-Butylphenylglycidylether und Phenylglycidylether bzw. zwischen p-tert-Butylphenylglycidylether und Kresylglycidylether war nicht im selben Maße ausgeprägt, woraus geschlossen wurde, dass p-tert-Butylphenylglycidylether eher ein eigenständiges Allergen ist.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

Phenylglycidylether ist ein starkes Allergen. Isolierte allergische Reaktionen auf Phenylglycidylether wurden bei Exponierten beobachtet; weitaus häufiger sind allerdings gleichzeitige Sensibilisierungen gegen Phenylglycidylether und DGEBA-Harz, und zwar sowohl bei Patienten mit Exposition gegenüber beiden Allergenen als auch bei Patienten, die nur gegen DGEBA-Harz, nicht aber gegen Phenylglycidylether exponiert waren.

Dass trotz seiner aktuell geringen Verbreitung in Epoxidharzsystemen häufig allergische Reaktionen beobachtet werden, dürfte an immunologischen Kreuzreaktionen bei primärer Sensibilisierung gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA und/oder DGEBAF liegen. Diese Kreuzreaktivität wurde auch im Tierversuch nachgewiesen [Pontén et al. 2004].

3.9.15 o-Kresylglycidylether, CAS Nr. 002210-79-9

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Sowohl o-Kresylglycidylether als auch das Isomerengemisch des Kresylglycidylether sind in Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe kaum verbreitet. Nach Informationen von GISBAU findet sich o-Kresylglycidylether in 14 Sicherheitsdatenblättern, davon wurden 5 in den Jahren 2006-2011 erstellt. Das Isomerengemisch des Kresylglycidylether wird in 24 Sicherheitsdatenblättern genannt, davon keines aus den Jahren 2006-2011. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

In den Publikationen zur Sensibilisierung gegen Kresylglycidylether beim Menschen ist nicht immer genau angegeben, worum es sich handelt. Teils schrieben die Autoren ausdrücklich „o-Kresylglycidylether“, teils war nur von Kresylglycidylether die Rede, teils wurde ausdrücklich eine CAS Nr. angegeben, oder es wurde darauf verwiesen, dass die Testzubereitung von Almirall Hermal stammte. Diese Firma gab als CAS Nr. ihrer Testzubereitung 26447-14-3 an, also die CAS Nr. des Isomerengemisches.

Es wurden keine Veröffentlichungen gefunden, in denen eindeutig erkennbar war, dass es sich um Untersuchungen mit o-Kresylglycidylether handelte.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

Es gibt nur wenige Berichte über Sensibilisierungen beim Menschen, in denen ausdrücklich o-Kresylglycidylether als Allergen bzw. Testsubstanz genannt ist. Einige Fälle von Kontaktallergie gegen o-Kresylglycidylether wurden beschrieben, meist mit gleichzeitiger Reaktion auf Phenylglycidylether.

3.9.16 Kresylglycidylether, Isomerengemisch, CAS Nr. 026447-14-3

Diese Komponente von Epoxidharzsystemen wurde bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht. Daher ist hier nur die Literatur zur Sensibilisierung beim Menschen ab 2012 berücksichtigt.

Sowohl o-Kresylglycidylether als auch das Isomerengemisch des Kresylglycidylether sind in Epoxidharzsystemen für das Baugewerbe kaum verbreitet. Nach Informationen von GISBAU findet sich o-Kresylglycidylether in 14 Sicherheitsdatenblättern, davon wurden 5 in den Jahren 2006-2011 erstellt. Das Isomerengemisch des Kresylglycidylether wird in 24 Sicherheitsdatenblättern genannt, davon keines aus den Jahren 2006-2011. Basis dieser Auswertung waren 3.692 bei GISBAU erfasste Sicherheitsdatenblätter, von denen 635 nach 2005 erstellt worden waren [Kersting 2011].

In den Publikationen zur Sensibilisierung gegen Kresylglycidylether beim Menschen ist nicht immer genau angegeben, worum es sich handelt. Teils schrieben die Autoren ausdrücklich „o-Kresylglycidylether“, teils war nur von Kresylglycidylether die Rede, teils wurde ausdrücklich eine CAS Nr. angegeben, oder es wurde darauf verwiesen, dass die Testzubereitung von Almirall Hermal stammte. Diese Firma gab als CAS Nr. ihrer Testzubereitung 26447-14-3 an, also die CAS Nr. des Isomerengemisches.

Es wurden keine Veröffentlichungen gefunden, in denen eindeutig erkennbar war, dass es sich um Untersuchungen mit o-Kresylglycidylether handelte. Daher wurden die entsprechenden Veröffentlichungen dem Isomerengemisch zugeordnet.

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen haben 2015 eine retrospektive Analyse der Fälle von Kontaktallergie gegen Reaktivverdünner in Epoxidharzsystemen publiziert, die im FIOH in den Jahren 1991 – 2014 beobachtet wurden [Aalto-Korte et al. 2015]. Kresylglycidylether (0,25% Vas.) wurde bis 2006 bei 647 Patienten epikutan getestet, von denen 16 (2,5%) allergisch reagierten. Bei 7 dieser 16 Patienten konnte an Hand der Sicherheitsdatenblätter der beruflich verwendeten Produkte (Fliesenkleber, Farben, Lacke) eine Exposition gegenüber Kresylglycidylether nachgewiesen werden. Die Testungen mit Kresylglycidylether wurden 2006 beendet. Bei allen 647 mit Kresylglycidylether getesteten Patienten wurde auch Phenylglycidylether (0,25% Vas.) getestet. Insgesamt reagierten 30 dieser Patienten auf

Phenylglycidylether, 16 auf Kresylglycidylether und davon 14 auf beide Reaktivverdünner. Es reagierten also 87,5% (14 von 16) der Patienten mit Sensibilisierung gegen Kresylglycidylether auch auf Phenylglycidylether, und in umgekehrter Richtung 46,7% (14 von 30). Auf dem finnischen Markt ist Kresylglycidylether nicht sehr verbreitet: In dem entsprechenden Produktregister sind nur 7 Epoxidharzprodukte genannt, die Kresylglycidylether enthalten.

Teile der Ergebnisse der IVDK-Datenanalyse, die im Rahmen des Vorgängerprojektes FP-0324 vorgenommen wurden, wurden 2016 veröffentlicht [Geier et al. 2016 a und b]. In den Jahren 2002 – 2011 lag in den dem IVDK angeschlossenen dermatologischen Abteilungen die Quote von Sensibilisierungen gegen Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% Vas.) bei 1,6% (1.453 von 93.406 Getesteten). Etwa die Hälfte der getesteten Betroffenen war auch gegen einen Reaktivverdünner oder einen Härter sensibilisiert. Unter den (bei 340 – 615 Epoxidharz-positiven Patienten) getesteten Reaktivverdünnern war 1,6-Hexandioldiglycidylether das häufigste Allergen (42%), gefolgt von 1,4-Butandioldiglycidylether (34%), Phenylglycidylether (29%) p-tert-Butylphenylglycidylether (27%), Kresylglycidylether (15%), Butylglycidylether (11%) und Trimethylolpropan-triglycidylether (8%). Unter den aromatischen Glycidylethern gab es Kreuzreaktionen. 95% der gegen Kresylglycidylether sensibilisierten Patienten reagierten auch auf Phenylglycidylether; umgekehrt waren dies 44%. Die Kreuzreaktivität zwischen p-tert-Butylphenylglycidylether und Phenylglycidylether bzw. zwischen p-tert-Butylphenylglycidylether und Kresylglycidylether war nicht im selben Maße ausgeprägt, woraus geschlossen wurde, dass p-tert-Butylphenylglycidylether eher ein eigenständiges Allergen ist.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Vergleich zur Voruntersuchung (FP-0324) ergibt sich keine Änderung der Bewertung.

Allergische Reaktionen auf Kresylglycidylether in Epoxidharzsystemen sind häufig beschrieben worden, meist gemeinsam mit Reaktionen auf Phenylglycidylether. Wegen der engen strukturellen Verwandtschaft zwischen Phenylglycidylether und Kresylglycidylether ist anzunehmen, dass immunologische Kreuzreaktionen vorkommen.

3.9.17 Propantriolglycidylether, CAS Nr. 090529-77-4 und 1,2,3-Propantriol, Polymer mit 2-(Chlormethyl)oxiran CAS Nr. 025038-04-4

3.9.17.1 Propantriolglycidylether, CAS Nr. 014228-73-0

Zu dieser Verbindung sind keine Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung am Menschen gefunden worden.

- Zusammenfassung und Bewertung.
Entfällt.

3.9.17.2 1,2,3-Propantriol, Polymer mit 2-(Chlormethyl)oxiran CAS Nr. 025038-04-4

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen haben 2015 eine retrospektive Analyse der Fälle von Kontaktallergie gegen Reaktivverdünner und verwandte aliphatische Epoxidharze publiziert, die im FIOH in den Jahren 1991 – 2014 beobachtet wurden [Aalto-Korte et al. 2015]. Ein Harz mit der CAS-Nr. 25038-04-4 (0,5% Vas.) wurde bei 203 Patienten epikutan getestet, von denen 2 (1,0%) allergisch reagierten. Eine entsprechende Exposition konnte jedoch bei diesen Patienten nicht festgestellt werden. Im finnischen Produktregister sind keine Epoxidharzprodukte genannt, die dieses Harz enthalten.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Insgesamt liegen zu wenige Informationen zur Sensibilisierung gegen Propantriolglycidylether beim Menschen vor, als dass man eine fundierte Bewertung angeben könnte.

**3.9.18 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat
(syn. 3,4-Epoxy cyclohexylmethyl-3',4'-epoxy cyclohexancarboxylat),
CAS Nr. 002386-87-0**

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Aalto-Korte und Mitarbeiterinnen haben 2015 eine retrospektive Analyse der Fälle von Kontaktallergie gegen Reaktivverdünner und verwandte aliphatische Epoxidharze publiziert, die im FIOH in den Jahren 1991 – 2014 beobachtet wurden [Aalto-Korte et al. 2015]. Ein Harz mit dieser CAS-Nr. wurde bei 389 Patienten epikutan getestet (Testkonzentration 0,5% Vas.), wobei keine positive (allergische) Reaktion auftrat. Im finnischen Produktregister sind nur 4 Epoxidharzprodukte genannt, die dieses Harz enthalten.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

Ende der 1990er Jahre wurden etliche Fälle von allergischem Kontaktekzem beschrieben, die durch ein Immersionsöl ausgelöst wurden, das u.a. ein modifiziertes cycloaliphatisches Epoxidharz auf Basis von 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat enthält. In einigen Fällen wurden zwar ein DGEBA-Epoxidharz und ein cycloaliphatisches Epoxidharz auf Basis von Hexahydrophthalsäurediglycidylester, nicht aber 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat getestet. Hier werden jedoch nur diejenigen Fälle referiert, in denen 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat auch tatsächlich getestet wurde.

Le Coz und Kollegen beschrieben 14 Fälle einer vermuteten Sensibilisierung gegen ein Immersionsöl, das neben einem Epoxidharz auf Basis von DGEBA auch etwa 45% eines modifizierten cycloaliphatischen Epoxidharzes auf Basis von 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat enthält. Fünf Patienten wurden mit dem unverdünnten Öl getestet, wobei in allen Fällen stark positive Reaktionen auftraten. Bei 2 weiteren Patienten wurde das Öl 1% Vas. getestet, wobei jeweils schwach positive Reaktionen auftraten. Diese beiden Patienten reagierten auch schwach positiv auf 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat (1% Vas.) und auf DGEBA-Epoxidharz (1% Vas.) [Le Coz et al. 1999].

Ein weiterer Patient mit einer Sensibilisierung gegen ein derartiges Immersionsöl reagierte im Epikutantest stark positiv auf das Immersionsöl (1% und 10% Vas.) und auf die in diesem Öl enthaltenen Komponenten „modifiziertes Bisphenol-Epoxidharz“ (keine weiteren Angaben), 1,4-Butandiolglycidylether und 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat (jeweils 2%, 5% und 10% Vas.). Außerdem ergaben sich schwach positive Reaktionen auf die kommerziell erhältliche Zubereitung eines cycloaliphatischen Epoxidharzes auf Basis von Hexahydrophthalsäurediglycidylester und auf Phenylglycidylether [Ahmed und Ilchyshyn 2000].

In einem weiteren Fall bestand eine andere mutmaßlich allergologisch relevante Exposition gegenüber 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat. Bei einem Mann mit multiplen, beruflich verursachten Sensibilisierungen gegen Epoxidharze auf Basis von DGEBA und DGEBF, sowie gegen cycloaliphatisches Epoxidharz auf Basis von Hexahydrophthalsäurediglycidylester und gegen mehrere Acrylate und Methacrylate trat eine allergische Reaktion auf die polymerisierte Epoxidharz-Beschichtung einer Monatsfahrkarte auf. Der Epikutantest mit der Fahrkarte war positiv. Das Ausgangsmaterial der Beschichtung enthielt zu 82–89% 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat; ein Epikutantest mit der Substanz selbst wurde jedoch nicht durchgeführt [Sasseville et al. 2002].

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Im Meerschweinchenmaximierungstest konnte für 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat ein hautsensibilisierendes Potential nachgewiesen werden. Darüber hinaus liegen mehrere Fallberichte von Kontaktallergie gegen diese Verbindung bei Exponierten vor. Daher kann man 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat als seltenes Allergen in Epoxidharzsystemen ansehen. Insgesamt liegen jedoch nur wenige Informationen zur Sensibilisierung beim Menschen vor, weil keine standardisierte Epikutantestzubereitung kommerziell angeboten wird, und daher entsprechende Testungen nur selten vorgenommen werden.

3.9.19 4,4'-Methylenbis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)anilin] **(syn. (Tetraglycidyl-4,4'-methyldianilin), CAS Nr. 028768-32-3)**

Tetraglycidyl-4,4'-methyldianilin wird unter anderem in vor-imprägnierten Composite-Materialien (so genannten Prepregs), z.B. in der Flugzeugindustrie, aber auch in Epoxidharzklebern, verwendet.

- Sensibilisierungshäufigkeiten in klinisch-epidemiologischen Untersuchungen oder seriellen Testungen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Berichte über Sensibilisierungen bei Exponierten.

In einer nordirischen Flugzeugfabrik kam es zu mehreren Fällen von Dermatitis an Händen, Unterarmen und im Gesicht. Bei 14 Patienten wurden das dort verwendete Composite-Material und/oder dessen Inhaltsstoffe epikutan getestet. Nur 3 von 12 Patienten reagierten auf das DGEBA-Epoxidharz, aber 7 von 10 auf Tetraglycidyl-4,4'-methyldianilin (1% Vas.) [Burrows et al. 1984].

In einer süditalienischen Flugzeugfabrik erkrankten 20 Arbeiter an einem Hand- und Gesichtsekzem. Eine chemische Analyse des verarbeiteten Composite-Materials ergab, dass Tetraglycidyl-4,4'-methyldianilin enthalten war. Bei 11 betroffenen Arbeitern wurde ein Epikutantest durchgeführt. Nur 4 reagierten auf das routinemäßig getestete Epoxidharz auf Basis von DGEBA; dagegen hatten 9 Arbeiter eine Sensibilisierung gegen Tetraglycidyl-4,4'-methyldianilin (Testkonzentration 1,25% in Aceton). Zehn der 11 getesteten Patienten reagierten außerdem auf Triglycidyl-p-aminophenol [Ayala et al. 1990].

Ein finnischer Beschäftigter in einer Flugzeugfabrik, der als Laminierer mit verschiedenen Prepregs Umgang hatte, erlitt ein allergisches Kontaktekzem. Im Epikutantest konnte eine Sensibilisierung gegen die beiden in den verwendeten Prepregs enthaltenen Verbindungen Tetraglycidyl-4,4'-methyldianilin und Triglycidyl-p-aminophenol nachgewiesen werden [Kanerva et al. 2000]

Im Finnish Institute of Occupational Health (FIOH) wurden in den Jahren 2004 – 2009 insgesamt 9 Patienten mit berufsbedingter Kontaktallergie gegen Tetraglycidyl-4,4'-methyldianilin gesehen, die sich beim Umgang mit einem Kleber sensibilisiert hatten, der Tetraglycidyl-4,4'-methyldianilin enthielt. Die Epikutantestungen mit Tetraglycidyl-4,4'-methyldianilin erfolgten in abgestuften Konzentrationen von 0,01% bis 1% in Vaseline. Zwei der betroffenen Patienten waren außerdem gegen Triglycidyl-p-aminophenol sensibilisiert [Pesonen et al. 2015].

- Untersuchungen zu Kreuzreaktionen.

Hierzu wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

- Zusammenfassung und Bewertung.

Es liegen mehrere gut dokumentierte Fallberichte von klinischer relevanter Sensibilisierung gegen Tetraglycidyl-4,4'-methyldianilin beim Menschen vor, so dass man davon ausgehen kann, dass diese Verbindung eindeutig ein Allergen ist. Da die Exposition wahrscheinlich begrenzt ist, wird über Sensibilisierungen gegen Tetraglycidyl-4,4'-methyldianilin nur relativ selten berichtet. Größere Studien fehlen.

4. Diskussion und Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit ist Teil des Forschungsvorhabens FP-0384, in dem Inhaltsstoffe von Epoxidharzsystemen nach ihrer sensibilisierenden Wirkstärke differenziert und, soweit möglich, klassifiziert werden sollen. Ziel dieser Arbeit war es, publizierte Daten zur sensibilisierenden Wirkung von Inhaltsstoffen von Epoxidharzsystemen an der Haut des Menschen zusammenzustellen und zu bewerten. Dabei lag der Schwerpunkt auf Untersuchungen an Patienten, die sich durch den Kontakt mit einem Epoxidharz-Produkt gegen einen oder mehrere Inhaltsstoffe sensibilisiert haben, und auf klinisch-epidemiologischen Daten, z.B. aus Reihenuntersuchungen.

Aufgrund der ausgewerteten Literatur und selbstverständlich unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Vorgängerprojektes FP-0324 wurde versucht, die Bedeutung der Epoxidharzsystem-Komponenten als Allergene quantitativ abzuschätzen. Hierzu wurden drei Kategorien gebildet:

H = häufiges (und daher bedeutendes) Allergen bei Ekzempatienten mit Exposition gegenüber Epoxidharzsystemen.

S = seltenes (und daher weniger bedeutendes) Allergen bei Ekzempatienten mit Exposition gegenüber Epoxidharzsystemen.

U = Häufigkeit und Bedeutung als Allergen unbekannt; die Substanz wurde am Menschen zu wenig oder gar nicht allergologisch untersucht, so dass man keine aussagekräftige diesbzgl. Abschätzung vornehmen konnte.

Es wurde Literatur zu den 67 Substanzen der vom Projektbegleitkreis vorgegebenen Liste gesucht und ausgewertet. 52 dieser Verbindungen wurden bereits im Vorgängerprojekt FP-0324 untersucht, 15 Substanzen kamen neu hinzu. Aufgrund der aktualisierten Literaturrecherche konnten 9 von den bereits in FP-0324 untersuchten und bisher als nicht einschätzbar angesehenen Substanzen kategorisiert werden. In 7 Fällen konnte eine Substanz nunmehr als seltenes Allergen eingeschätzt werden, und in 2 Fällen als häufiges Allergen. Insgesamt ergab sich Folgendes:

- 14 Substanzen wurden als häufige Allergene („H“) in Epoxidharzsystemen angesehen.
- 16 Substanzen wurden als seltene Allergene („S“) in Epoxidharzsystemen angesehen.
- Für 37 Substanzen war eine quantitative Abschätzung nicht möglich („U“).

Einteilung der 67 vom Projektbegleitkreis vorgegebenen Substanzen in die Kategorien H (häufiges Allergen in Epoxidharzsystemen), S (seltenes Allergen in Epoxidharzsystemen) und U (unbekannt, quantitative Abschätzung nicht möglich).

Abschnitt	Substanz	CAS Nr.	Kategorie
3.1	Epoxidharze		
3.1.1	Bisphenol A-Harze	025068-38-6	H
3.1.2	Reaktionsprodukt Bisphenol A Epichlorhydrin	025085-99-8	H
3.1.3	Bisphenol-A-Epichlorhydrin MW 340	001675-54-3	H
3.1.4	Bisphenol F-Harze	009003-36-5	H
3.1.5	Bisphenol-F-Epichlorhydrin	028064-14-4	H
3.1.6	Epoxidharz-Monomere aus O'Boyle et al. 2012 und 2014	013410-58-7 003530-44-7	U
3.2	Härter, aromatische Amine		
3.2.1	4,4'-Diaminodiphenylmethan	000101-77-9	U
3.3	Härter, aliphatische Amine		
3.3.1	Ethylendiamin	000107-15-3	S
3.3.2	Diethylentriamin	000111-40-0	S
3.3.3	Dipropylentriamin	000056-18-8	S
3.3.4	Trimethylhexamethylendiamin	025620-58-0	S
3.3.5	Triethylentetramin	000112-24-3	S
3.3.6	N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan	000109-55-7	U
3.3.7	Tetraethylenpentamin	000112-57-2	S
3.3.8	Pentaethylenhexamin	004067-16-7	U
3.3.9	Polyethylenpolyamin	068131-73-7	U
3.3.10	Polyethylenamine	026336-38-9	U
3.3.11	N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin	002372-82-9	U
3.3.12	2,2,4-Trimethylhexan-1,6-diamin	025513-64-8	S
3.4	Härter, cycloaliphatische Amine		
3.4.1	4,4'-Diaminocyclohexylmethan	001761-71-3	U
3.4.2	Bis(4-(1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethylamino)-3-methylcyclohexyl)methan	136210-32-7	U
3.4.3	N-Aminoethylpiperazin	000140-31-8	S
3.4.4	Isophorondiamin	002855-13-2	H
3.4.5	3-Cyclohexylaminopropylamin	003312-60-5	U

3.4.6	1,2-Diaminocyclohexan	000694-83-7	U
3.4.7	1,3-Cyclohexylen-bis(methylamin)	002579-20-6	U
3.5	Härter, sonstige		
3.5.1	m-Xylidendiamin	001477-55-0	H
3.5.2	m-Xylylendiamin/Acrylnitril Adduct	073050-11-0	U
3.5.3	N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan	001760-24-3	U
3.5.4	Polyoxyalkylenamin	002997-01-5	U
3.5.5	3-Aminopropyltriethoxysilan	000919-30-2	U
3.5.6	Oligomerisierter Härter: 4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin	038294-64-3	U
3.5.7	Formaldehyd, Polymer mit Benzenamin, hydriert	135108-88-2	U
3.5.8	Polyethylenpoly-, triethylentetramin	090640-46-3	U
3.6	Dicarbonsäureanhydride		
3.6.1	Phthalsäureanhydrid	000085-44-9	U
3.6.2	Tetrahydrophthalsäureanhydrid	000085-43-8	U
3.6.3	Hexahydrophthalsäureanhydrid	000085-42-7	U
3.6.4	Methyltetrahydrophthalsäureanhydrid	011070-44-3	U
3.6.5	Methylhexahydrophthalsäureanhydrid	025550-51-0	S
3.7	Sekundäre und tertiäre Amine		
3.7.1	3-((6-Aminotrimethylhexyl)amino)propionitril	093941-62-9	U
3.7.2	N,N-Dimethyl-cyclohexanamin	000098-94-2	U
3.8	Phenole		
3.8.1	p-tert-Butylphenol	000098-54-4	S
3.8.2	Bisphenol A	000080-05-7	S
3.8.3	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	000090-72-2	H
3.8.4	Bis[(dimethylamino)methyl]phenol	071074-89-0	U
3.9	Reaktivverdünner		
3.9.1	Butylglycidylether	002426-08-6	S
3.9.2	1,4-Butandiol diglycidylether	002425-79-8	H
3.9.3	Neopentylglykol-diglycidylether	017557-23-2	U
3.9.4	2-Ethylhexylglycidylether	002461-15-6	U
3.9.5	1,6-Hexandiol diglycidylether	016096-31-4	H

3.9.6	Versaticsäureglycidylester (z.B. Cadura E 10) 2,2'-Dioctyldecansäure-2,3 epoxypropylester	026761-45-5	S
3.9.7	Trimethylolpropan-triglycidylether	030499-70-8	U
3.9.8	C12/C14-Monoglycidylether	068609-97-2	U
3.9.9	Polypropylenglykoldiglycidylether / Polyoxypropylen-diglycidylether	026142-30-3	U
3.9.10	Polypropylenglykol (chlormethyl)oxiran Polymer	009072-62-2	S
3.9.11	Dipropylenglykol-diglycidylether	041638-13-5	U
3.9.12	Cyclohexandimethanol-diglycidylether Cyclohexandimethanol-divinylether	014228-73-0 017351-75-6	U U
3.9.13	p-tert-Butylphenylglycidylether	003101-60-8	H
3.9.14	Phenylglycidylether	000122-60-1	H
3.9.15	o-Kresylglycidylether	002210-79-9	H
3.9.16	Kresylglycidylether, Isomerengemisch	026447-14-3	H
3.9.17	Propantriolglycidylether 1,2,3-Propantriol, Polymer mit 2- (Chlormethyl)oxiran	090529-77-4 025038-04-4	U
3.9.18	7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7- oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat	002386-87-0	S
3.9.19	4,4'-Methylenbis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)anilin]	028768-32-3	S

Zu den einzelnen Gruppen:

H = häufige Allergene bei Ekzempatienten mit Exposition gegenüber Epoxidharzsystemen.

Dies sind die Oligomere der Bisphenol A-Harze und der Bisphenol F-Harze (5 Substanzen der Liste), die Härter Isophorondiamin und m-Xylidendiamin, der Beschleuniger 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol, sowie die Reaktivverdünner 1,4-Butandiolglycidylether, 1,6-Hexandiolglycidylether, Phenylglycidylether, p-tert-Butylphenolglycidylether und Kresylglycidylether (in der Liste als o-Kresylglycidylether und als Isomerengemisch aufgeführt).

S = seltene Allergen bei Ekzempatienten mit Exposition gegenüber Epoxidharzsystemen.

Dies sind die Härter Ethylendiamin, Diethylentriamin, Dipropylendiamin, Trimethylhexamethylendiamin (als 2,2,4-Trimethylhexan-1,6-diamin und 2,4,4-Trimethyl-1,6-hexandiamin), Triethylentetramin, Tetraethylenpentamin, N-Aminoethylpiperazin, und Methylhexahydrophthalsäureanhydrid, die Phenole tert-Butylphenol und Bisphenol A, die Reaktivverdünner Butylglycidylether und Versaticsäureglycidylester, sowie die Harze Polypropylenglykol (chloromethyl)oxiran Polymer, 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat und 4,4'-Methylenbis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)anilin].

U = Häufigkeit und Bedeutung als Allergen unbekannt.

Dies ist mit 37 Substanzen die größte Gruppe. An dieser Stelle sollen nicht alle Substanzen aufgelistet werden; einige allergologisch bedeutsame Aspekte sollen jedoch dargestellt werden.

Sensibilisierungen gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan wurden mehrfach beschrieben. Dabei kann es sich um originäre Sensibilisierungen gegen diese Verbindung handeln. Es können aber auch immunologische Kreuzreaktionen bei primärer Sensibilisierung gegen andere in Para-Stellung disubstituierte aromatische Amine, insbesondere p-Phenylendiamin oder p-Aminoazobenzol, vorliegen. Außerdem kann eine Sensibilisierung gegen 4,4'-Diaminodiphenylmethan durch den Kontakt mit Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat erworben sein. Da Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit, wie es auf der Haut gegeben ist, zunächst zu 4,4'-Diaminodiphenylmethan reagiert, ist bei Exposition gegenüber Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat immer auch eine Exposition gegenüber 4,4'-Diaminodiphenylmethan gegeben, die zu einer entsprechenden Sensibilisierung führen kann. Sensibilisierungen gegen N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan wurden im Zusammenhang mit Epoxidharzsystemen nicht beschrieben. Es spricht einiges dafür, dass N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan, das als Verunreinigung in Cocamidopropylbetain enthalten war, bei vielen

Fällen von allergischem Kontaktekzem durch Cocamidopropylbetain als das verantwortliche Allergen anzusehen war.

Säureanhydride wie Phthalsäureanhydrid oder dessen Derivate Tetrahydrophthalsäureanhydrid, Hexahydrophthalsäureanhydrid, Methyltetrahydrophthalsäureanhydrid und Methylhexahydrophthalsäureanhydrid werden als Härter in heißhärtenden Epoxidharzsystemen eingesetzt. Sie finden vorwiegend im Bau von Transformatoren, elektrischen Geräten usw. Verwendung. Phthalsäureanhydrid und dessen Derivate sind als Auslöser von beruflich bedingten allergischen Atemwegserkrankungen bekannt; auch Fälle von Kontakturtikaria mit nachgewiesener Typ I-Sensibilisierung wurden mehrfach beobachtet. Lediglich für Methyltetrahydrophthalsäureanhydrid liegen nunmehr auch umfangreichere Daten zur Typ IV-Sensibilisierung beim Menschen aus dem FIOH vor, so dass man jetzt davon ausgehen kann, dass solche Sensibilisierungen selten sind.

Allergene in den Harzen.

Die häufigsten und wichtigsten Allergene in Epoxidharzsystemen sind Oligomere eines Epoxidharzes auf Basis von Bisphenol A Diglycidylether (DGEBA). Auch die Oligomere eines Epoxidharzes auf Basis von Bisphenol F Diglycidylether (DGEBF) sind wichtige Allergene, wobei immunologische Kreuzreaktionen mit dem DGEBA-Harz nachgewiesen wurden.

Polypropylenglykol (chloromethyl)oxirane polymer, 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat und 4,4'-Methylenbis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)anilin] wurden jetzt erstmals untersucht. Aufgrund der umfangreichen seriellen Testungen im FIOH kann man davon ausgehen, dass in seltenen Fällen Sensibilisierungen gegen Polypropylene glycol chloromethyloxirane polymer vorliegen können. Außerdem liegen mehrere gut dokumentierte Fallberichte von klinische relevanter Sensibilisierung gegen 7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat bzw. 4,4'-Methylenbis[N,N-bis(2,3-epoxypropyl)anilin] beim Menschen vor, so dass man auch hier davon ausgehen kann, dass diese Verbindungen (zumindest) seltene Allergene sind.

Ein Ausgangsstoff für die Herstellung von DGEBA-Harzen ist Bisphenol A. In Reihentestungen erwies sich Bisphenol A zwar als seltenes Allergen. In Einzelfällen wurde aber eine klinische relevante Kontaktallergie gegen Bisphenol A nachgewiesen, wobei nicht nur Epoxidharze im Stadium der Produktion oder der Verarbeitung die Allergenquelle darstellten. Auch andere Expositionen, z.B. das Tragen von PVC-Handschuhen, in denen Bisphenol A als Antioxidans enthalten war, wurden als Sensibilisierungsquellen genannt. Offenbar gibt es auch immunologische Kreuzreaktionen bei primärer Sensibilisierung gegen Diethylstilbestrol oder chemisch verwandte Stoffe, die zu einer Kontaktallergie gegen Bisphenol A führen können.

Allergene in den Härtern.

Unter den Härtern für kalthärtende Epoxidharzsysteme sind m-Xylidendiamin und Isophorondiamin die häufigsten und wichtigsten Allergene.

Aufgrund der umfangreichen seriellen Testungen im FIOH, bei denen sich 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol als das zweithäufigste Allergen unter den Härtern bzw. Beschleunigern für Epoxidharzsysteme erwies, kann man nunmehr die Einschätzung angeben, dass auch 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol als ein häufiges Allergen in diesem Bereich anzusehen ist.

Ethylendiamin ist als Allergen mit sensibilisierenden Eigenschaften sowohl an der Haut als auch an den Atemwegen bekannt. Ethylendiamin wird nicht nur in Epoxidharzsystemen, sondern auch als Hilfsstoff in Schmierstoffen und Medikamenten verwendet, wo entsprechende Sensibilisierungen erworben werden können.

Sensibilisierungen gegen Diethylentriamin werden bei exponierten Patienten selten beobachtet, wahrscheinlich weil die Substanz aktuell eher nur gering bis mäßig in Epoxidharzsystemen verbreitet ist.

Allergische Reaktionen auf Triethylentetramin wurden bei Patienten, die wegen des Verdachtes auf eine Epoxidharz-Allergie getestet wurden, mit unterschiedlicher Häufigkeit beobachtet. Während Berichte mit hohen Reaktionsquoten auf zum Teil recht hohe Testkonzentrationen aus Polen aus den 1970er Jahren stammen, zeigen aktuellere Reihenuntersuchungen aus anderen Teilen Europas und aus den USA deutlich geringere Reaktionsquoten.

Kreuzallergien zwischen Ethylendiamin, Diethylentriamin und/oder Triethylentetramin werden aufgrund gleichzeitig auftretender Reaktionen im Epikutantest diskutiert, können aber anhand der vorliegenden Unterlagen nicht als gesichert angesehen werden.

Aufgrund der nunmehr vorliegenden umfangreicheren Daten aus dem FIOH kann man jetzt davon ausgehen, dass Sensibilisierungen gegen Dipropylentriamin, Tetraethylenpentamin Trimethylhexamethylendiamin und N-Aminoethylpiperazin selten sind.

Allergene in den Reaktivverdünnern.

Unter den Reaktivverdünnern sind 1,6-Hexandioldiglycidylether und 1,4-Butandiol-diglycidylether die häufigsten Allergene, mit einer hohen Quote konkordanter Reaktionen, die wahrscheinlich durch immunologische Kreuzreaktionen bedingt sind.

Trotz aktuell nur noch geringer Verbreitung in Epoxidharzsystemen werden Sensibilisierungen gegen Phenylglycidylether relativ häufig beobachtet. Dies hat seinen Grund sehr wahrscheinlich in immunologischen Kreuzreaktionen bei primärer Sensibilisierung gegen DGEBA.

Auch allergische Reaktionen auf Kresylglycidylether in Epoxidharzsystemen sind häufig beschrieben worden, meist gemeinsam mit Reaktionen auf Phenylglycidylether. Wegen der engen strukturellen Verwandtschaft zwischen Phenylglycidylether und Kresylglycidylether ist anzunehmen, dass immunologische Kreuzreaktionen vorkommen. Meist wurde das Isomerengemisch des Kresylglycidylethers getestet, und nicht der reine o-Kresylglycidylether.

Insgesamt liegen nunmehr auch ausreichend viele Humandaten zur Sensibilisierung gegen p-tert-Butylphenylglycidylether und umfangreichere Analysen zu etwaigen Kreuzreaktionen vor. Vieles spricht dafür, dass p-tert-Butylphenylglycidylether ein eigenständiges Allergen ist, und Sensibilisierungen gegen p-tert-Butylphenylglycidylether nicht (immer) Ausdruck einer immunologischen Kreuzreaktion bei primärer Sensibilisierung gegen einen anderen Glycidylether sind. Die relativ hohen Sensibilisierungsquoten sprechen vor allem vor dem Hintergrund der offenbar nicht besonders großen Verbreitung von p-tert-Butylphenylglycidylether dafür, dass es sich um ein eher starkes Allergen handelt.

Allergische Reaktionen auf Butylglycidylether werden bei Patienten mit Verdacht auf Epoxidharz-Allergie mäßig häufig beobachtet. Möglicher Weise entstehen allergische Reaktionen gegen Butylglycidylether auf dem Boden einer immunologischen Kreuzreaktion bei primärer Sensibilisierung gegen 1,4-Butandiolglycidylether.

Es liegen nunmehr auch umfangreichere Daten aus dem FIOH zur Sensibilisierung gegen Versaticsäureglycidylester vor. Insgesamt kann man davon ausgehen, dass Sensibilisierungen gegen Versaticsäureglycidylester selten sind.

Die Bewertung der gefundenen Daten und damit die Vergleichbarkeit der einzelnen Komponenten von Epoxidharzsystemen wird durch folgende Faktoren erschwert:

1. Die Zahl bzw. Quote der sensibilisierten Patienten müsste in Beziehung zur Zahl der Exponierten gesetzt werden. Hierzu liegen aber keine Daten vor. Es fehlt also gewissermaßen der Nenner des Quotienten. Hilfsweise wurde hier die Zahl der bei dem Gefahrstoff-Informationssystem der BG BAU registrierten Sicherheitsdatenblätter herangezogen, in dem der jeweilige Stoff genannt ist. Auf diese Weise ist zumindest in gewisser Weise eine orientierende quantitative Abschätzung der Verbreitung möglich.

2. Nur ein Teil der allergologisch relevanten Komponenten von Epoxidharzsystemen ist als Testzubereitung für den Epikutantest kommerziell erhältlich. Dies führt zu einer Verzerrung der diagnostizierten und publizierten Sensibilisierungshäufigkeiten.
 - 2.1. Kommerziell erhältliche Testzubereitungen werden häufiger epikutan getestet, zum Teil auch ohne dass der betroffene Patient konkret exponiert war. Positive Testreaktionen werden dann als allergisch registriert, ohne dass die klinische Relevanz geklärt wird oder werden kann.
 - 2.2. Nicht als Testzubereitung kommerziell erhältliche Allergene werden sehr oft trotz entsprechender Indikation nicht getestet, so dass Sensibilisierungen gegen diese Stoffe zu selten diagnostiziert und dementsprechend auch zu selten berichtet werden („underreporting“).

Daher ist auf der Basis der hier betrachteten Publikationen nur eine sehr grobe und zurückhaltend zu beurteilende Einteilung in häufige und seltene Allergene möglich. Zumindest die Extreme sollten aber in die allergologische Gesamtbeurteilung eines Stoffes einfließen.

5. Literatur

- Aalto-Korte K, Suuronen K, Kuuliala O, Henriks-Eckerman M-L, Jolanki R. Occupational contact allergy to monomeric isocyanates. *Contact Dermatitis* 2012; 67: 78-88
- Aalto-Korte K, Suuronen K, Kuuliala O, Henriks-Eckerman M-L, Jolanki R. Contact allergy to epoxy hardeners. *Contact Dermatitis* 2014a; 71: 145-153
- Aalto-Korte K, Suuronen K, Kuuliala O, Henriks-Eckerman M-L, Jolanki R. Screening occupational contact allergy to bisphenol F epoxy resin. *Contact Dermatitis* 2014b; 71: 138-144
- Ahmed I, Ilchyshyn A. Immersion oil allergy with no reaction to epoxy resin in the standard series. *Contact Dermatitis* 2000; 43: 125-126
- Aalto-Korte K, Kuuliala O, Henriks-Eckerman M-L, Suuronen K. Contact allergy to reactive diluents and related aliphatic epoxy resins. *Contact Dermatitis* 2015; 72: 387-397
- Angelini G, Foti C, Rigano L, Vena GA. 3-Dimethylaminopropylamine: a key substance in contact allergy to cocamidopropylbetaine? *Contact Dermatitis* 1995; 32: 96-99
- Ayala F, Lembo G, Balato N, Patruno C, Scognamiglio G, Strazullo G, de Stefano S. The use of laboratory methods in contact dermatitis induced by composite materials. *Contact dermatitis* 1990; 22: 262-266
- Bangsgaard N, Thyssen JP, Menné T, Andersen KE, Mortz CG, Paulsen E, Sommerlund M, Veien NK, Laurberg G, Kaaber K, Thormann J, Andersen BL, Danielsen A, Avnstorp C, Kristensen B, Kristensen O, Vissing S, Nielsen NH, Johansen JD. Contact allergy to epoxy resin: risk occupations and consequences. *Contact Dermatitis* 2012; 67: 73-77
- Berglind IA, Lind M-L, Lidén C. Epoxy pipe relining – an emerging contact allergy risk for workers. *Contact Dermatitis* 2012; 67: 59-65
- Breuer K, Lipperheide C, Lipke U, Zapf T, Dickel H, Treudler R, Molin S, Mahler V, Pfoehler C, Löffler H, Schwantes H, Schnuch A. Contact allergy induced by bisphenol A diglycidyl ether leachables from aluminium tubes for pharmaceutical use. *Allergy* 2015; 70: 220-226
- Burrows D, Fregert S, Campbell H, Trulsson L. Contact dermatitis from the epoxy resins tetraglycidyl-4,4'-methylene dianiline and o-diglycidyl phthalate in composite material. *Contact Dermatitis* 1984; 11: 80-82
- de Groot A, van der Walle HB, Weyland W. Contact allergy to cocamidopropylbetaine. *Contact Dermatitis* 1995; 33: 419-422
- Dejobert Y, Martin P, Piette F, Thomas P, Bergoend H. Contact dermatitis from didecyldimethylammonium chloride and bis-(aminopropyl)-lauryl amine in a detergent-disinfectant used in hospital. *Contact Dermatitis* 1997; 37: 95-96
- Dibo M, Brasch J. Occupational allergic contact dermatitis from N,N-bis(3-aminopropyl)dodecylamine and dimethyldidecylammonium chloride in 2 hospital staff. *Contact Dermatitis* 2001; 45: 40
- Engfeldt M, Goossens A, Isaksson M, Zimerson E, Bruze M. The outcome of 9 years of consecutive patch testing with 4,4'-diaminodiphenylmethane and 4,4'-diphenylmethane diisocyanate. *Contact Dermatitis* 2013; 68: 98-102

- Foti C, Bonamonte D, Mascolo G, Corcelli A, Lobasso S, Rigano L, Angelini G. The role of 3-dimethylaminopropylamine and amidoamine in contact allergy to cocamidopropylbetaine. *Contact Dermatitis* 2003; 48: 194-198
- Frick-Engfeldt M, Isaksson M, Zimerson E, Bruze M. How to optimize patch testing with diphenylmethane diisocyanate. *Contact Dermatitis* 2007; 57: 138-151
- Geier J, Krautheim A, Fuchs T. Airborne allergic contact dermatitis in a parquet fitter. *Contact Dermatitis* 2012; 67: 106-108
- Geier J, Lessmann H, Hillen U, Skudlik C, Jappe U. Sensitization to reactive diluents and hardeners in epoxy resin systems. IVDK data 2002 – 2011. Part I: reaction frequencies. *Contact Dermatitis* 2016a; 74: 83-93
- Geier J, Lessmann H, Hillen U, Skudlik C, Jappe U. Sensitization to reactive diluents and hardeners in epoxy resin systems. IVDK data 2002 – 2011. Part II: concomitant reactions. *Contact Dermatitis* 2016b; 74: 94-101
- Goodson A, Powell D. Contact dermatitis to epoxy resins presenting as conjunctivitis. *Dermatitis* 2014; 25: 34
- Hagvall L, Niklasson IB, Rudbäck J, O'Boyle NM, Niklasson E, Luthman K, Karlberg AT. Assessment of cross-reactivity of new less sensitizing epoxy resin monomers in epoxy resin-allergic individuals. *Contact Dermatitis* 2016; 75: 144-150
- Houle MC, Holness DL, Dekoven J, Skotnicki S. Additive value of patch testing custom epoxy materials from the workplace at the occupational disease specialty clinic in Toronto. *Dermatitis* 2012; 23: 214-219
- Kanerva L, Jolanki R, Estlander T, Henriks-Eckerman M, Tuomi M, Tarvainen K. Airborne occupational allergic contact dermatitis from triglycidyl-p-aminophenol and tetraglycidyl-4,4'-methylene dianiline in preimpregnated epoxy products in the aircraft industry. *Dermatology* 2000; 201: 29-33
- Kawamoto T, Tsuji M, Isse T. Comparison of IgG against plastic resin in workers with and without dermatitis. *BioMed Central Public Health* 2015; 15: 930
- Kersting K, GISBAU, persönliche Mitteilung 2011
- Kwok T, Rosen CF, Storrs FJ, Lonel E, DeKoven JG. Persistent photosensitivity after allergic contact dermatitis to epoxy resin. *Dermatitis* 2013; 24: 124-130
- Le Coz CJ, Coninx D, Van Rengen A, El Aboubi S, Ducombs G, Benz MH, Boursier S, Avenel-Audran M, Verret JL, Erikstam U, Bruze M, Goossens A. An epidemic of occupational contact dermatitis from an immersion oil for microscopy in laboratory personnel. *Contact Dermatitis* 1999; 40: 77-83
- Lolatgis HA, Nixon R. Allergic contact dermatitis following epoxy resin exposure to a paint in a recreational setting. *Australasian Journal of Dermatology* 2015; 56: 312-313
- Mose AP, Lundov MD, Zachariae C, Menné T, Veien NK, Laurberg G, Kaaber K, Avnstorp C, Andersen KE, Paulsen E, Mortz CG, Sommerlund M, Danielsen A, Thormann J, Kristensen O, Kristensen B, Andersen BL, Vissing S, Nielsen NH, Johansen JD. Occupational contact dermatitis in painters - an analysis of patch test data from the Danish Contact Dermatitis Group. *Contact Dermatitis* 2012; 67: 293-297

- O'Boyle NM, Niklasson IB, Tehrani-Bagha AR, Delaine T, Holmberg K, Luthman K, Karlberg AT. Epoxy resin monomers with reduced skin sensitizing potency. *Chem Res Toxicol* 2014; 27: 1002-1010
- O'Boyle NM, Delaine T, Luthman K, Natsch A, Karlberg AT. Analogues of the epoxy resin monomer diglycidyl ether of bisphenol F: effects on contact allergenic potency and cytotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2012; 25: 2469-2478
- Özkaya E. Neighborial allergy: a hidden cause of nonoccupational airborne contact dermatitis in a housewife from epoxy resin. *Dermatitis* 2012; 23: 124-125
- Pesonen M, Suuronen K, Jolanki R, Aalto-Korte K, Kuuliala O, Henriks-Eckerman M-L, Valtanen I, Alanko K. Occupational contact dermatitis caused by aniline epoxy resins in the aircraft industry. *Contact Dermatitis* 2015; 73: 113-118
- Pontén A, Zimerson E, Bruze M. Sensitizing capacity and cross-reactivity of phenyl glycidyl ether. *Contact Dermatitis* 2004; 50: 166
- Prodi A, Rui F, Belloni Fortina A, Corradin MT, Larese Filon F. Occupational sensitization to epoxy resins in northeastern Italy. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 2015; 21: 82-87
- Rui F, Bovenzi M, Prodi A, Filon FL. [Cutaneous allergy in construction workers]. *G Ital Med Lav Ergon* 2012; 34 (3 Suppl): 153-155
- Sasseville D, Hakim M, Muhn C. Bus pass dermatitis. *American Journal of Contact Dermatitis* 2002; 13: 146-147
- Schliemann S, Zahlten A, Krautheim A, Elsner P. Occupational allergic contact dermatitis caused by N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in a surface disinfectant. *Contact Dermatitis* 2010; 63: 290-291
- Schnuch A, Lessmann H, Geier J, Uter W. Is cocamidopropyl betaine a contact allergen? Analysis of network data and short review of the literature. *Contact Dermatitis* 2011; 64: 203-211
- Schwensen JF, Menné T, Veien NK, Funding AT, Avnstorp C, Østerballe M, Andersen KE, Paulsen E, Mortz CG, Sommerlund M, Danielsen A, Andersen BL, Thormann J, Kristensen O, Kristensen B, Vissing S, Nielsen NH, Thyssen JP, Johansen JD. Occupational contact dermatitis in blue-collar workers: results from a multicentre study from the Danish Contact Dermatitis Group (2003-2012). *Contact Dermatitis* 2014; 71: 348-355
- Soemantri SP, Dickel H. Serie „Das kleine 1 x 1 der Immunologie“ – Teil 22. Das allergische Kontaktekzem. *Allergo Journal* 2015; 24: 14-16
- Uter W, Lessmann H, Geier J, Becker D, Fuchs Th, Richter G. The spectrum of allergic (cross-)sensitivity in clinical patch testing with 'para amino' compounds. *Allergy* 2002; 57: 319-322

**ANHANG 3 – STUDIENBERICHTE DER PROJEKTSPEZIFISCHEN *IN VITRO* TESTUNG
IM DPRA**



We create chemistry

STUDY TITLE

Summary Report

In Vitro Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay
(DPRA)

TEST GUIDELINE(S)

OECD 442C

AUTHOR

B. Wareing B.Sc. (Study Director)

TEST FACILITY

BASF SE
Experimental Toxicology and Ecology
67056 Ludwigshafen, Germany

TEST FACILITY PROJECT IDENTIFICATION

Project Nos.:

64V0689/05A052; 64V0691/05A051; 64V0349/13A509; 64V0574/15A197; 64V0575/15A198;
64V0576/15A199; 64V0577/15A200; 64V0578/15A201; 64V0579/15A202; 64V0580/15A203

SPONSOR

Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Klarastraße 63
79106 Freiburg, Germany

This document contains manufacturing and trade secrets of the Sponsor(s). It is the property of the Sponsor(s) and may be used only for that purpose for which it was intended by the Sponsor(s). Every other or additional use, exploitation, reproduction, publication or submission to other parties require the written permission of the Sponsor(s), with the exception of regulatory agencies acting within the limits of their administrative authority.

Summary report; Project Nos.:

64V0689/05A052; 64V0691/05A051; 64V0349/13A509; 64V0574/15A197; 64V0575/15A198;
64V0576/15A199; 64V0577/15A200; 64V0578/15A201; 64V0579/15A202; 64V0580/15A203

1. INTRODUCTION

The present summary report unites the results of 10 Direct Peptide Reactivity Assays performed as separate studies under the project nos. 64V0689/05A052; 64V0691/05A051; 64V0349/13A509; 64V0574/15A197; 64V0575/15A198; 64V0576/15A199; 64V0577/15A200; 64V0578/15A201; 64V0579/15A202; 64V0580/15A203.

The conduct and evaluation of the studies is given in the present summary report briefly. All details may be taken from the respective study reports. This document summarized the essential results, only.

1.1. METHOD

In the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) the reactivity of a test item (=test substance) towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides is evaluated. For this purpose the test substance is incubated with synthetic peptides for 24 hours at ca. 25 °C and the remaining non-depleted peptide concentration is determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution and UV-detection at 220 nm. The peptides are custom-made material containing phenylalanine to facilitate UV-detection and either cysteine or lysine as the reactive center.

The test substances were dissolved at a 100 mM concentration in acetonitrile. Three samples of the test substance were incubated with each peptide in ratios of 1:10 (for C-peptide; Ac-RFAACAA-COOH (MW=751.9 g/mol)) or 1:50 (for K-peptide; Ac-RFAAKAA-COOH (MW=776.2 g/mol)). Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides. The peptide depletion of test-substance incubated samples was compared to the peptide depletion of the NC samples and expressed as relative peptide depletion.

2. TEST SUBSTANCES

This section contains basic information on the chemicals tested, only. Further information is available from the full report of the respective test substance.

Name of test substance:	1,6-Hexandiol-DGE (s0347)
Project No.:	64V0689/05A052
Batch identification:	801 150
CAS No.:	16096-31-4

Summary report; Project Nos.:

64V0689/05A052; 64V0691/05A051; 64V0349/13A509; 64V0574/15A197; 64V0575/15A198;
64V0576/15A199; 64V0577/15A200; 64V0578/15A201; 64V0579/15A202; 64V0580/15A203

Name of test substance: **C12/C14-Mono-GE**

Project No.: 64V0691/05A051

Batch identification: MKBH6600V

CAS No.: 68609-97-2

Name of test substance: **Butyl glycidyl ether**

Project No.: 64V0349/13A509

Batch identification: BCBH4941V

CAS No.: 2426-08-6

Name of test substance: **2-Ethylhexyl-GE**

Project No.: 64V0574/15A197

Batch identification: STBF3150V

CAS No.: 2461-15-6

Name of test substance: **Phenyl-GE**

Project No.: 64V0575/15A198

Batch identification: BCBN6286V

CAS No.: 122-60-1

Name of test substance: **o-Kresylglycidylether**

Project No.: 64V0576/15A199

Batch identification: MKBP7140V

CAS No.: 2210-79-9

Summary report; Project Nos.:

64V0689/05A052; 64V0691/05A051; 64V0349/13A509; 64V0574/15A197; 64V0575/15A198;
64V0576/15A199; 64V0577/15A200; 64V0578/15A201; 64V0579/15A202; 64V0580/15A203

Name of test substance: **1,4-Butanol-DGE**

Project No.: 64V0577/15A200

Batch identification: MKBS1346V

CAS No.: 2425-79-8

Name of test substance: **Neopentylglykol-DGE**

Project No.: 64V0578/15A201

Batch identification: MKBR3896V

CAS No.: 17557-23-2

Name of test substance: **Polypropylenglykol-DGE**

Project No.: 64V0579/15A202

Batch identification: MKBQ0052V

CAS No.: 26142-30-3

Name of test substance: **Trimethylolpropan-TGE**

Project No.: 64V0580/15A203

Batch identification: MKBQ5700V

CAS Nos.: 30499-70-8; 3454-29-3

Summary report; Project Nos.:

64V0689/05A052; 64V0691/05A051; 64V0349/13A509; 64V0574/15A197; 64V0575/15A198;
64V0576/15A199; 64V0577/15A200; 64V0578/15A201; 64V0579/15A202; 64V0580/15A203

3. EVALUATION OF RESULTS

3.1. PEPTIDE DEPLETION

Chemical reactivity was determined by mean peptide depletion [%] and was rated as high, moderate, low, or minimal:

Table 1: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model.

Mean peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 42.47	high reactivity	positive
> 22.62 ≤ 42.47	moderate reactivity	positive
> 8.11 ≤ 22.62	low reactivity	positive
> 4.65 ≤ 8.11	no to low reactivity	borderline ¹
≤ 4.65	minimal or no reactivity	negative

In the case mean peptide depletion [%] cannot be determined due to invalid K-peptide depletion (e.g. insolubility of the K-peptide samples or interference in the samples of the K-peptide) but valid C-peptide depletion is available, evaluation is performed as follows:

¹ The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 6.38 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 6.38 ≤ 22.62 as “positive” (low reactivity).

Summary report; Project Nos.:

64V0689/05A052; 64V0691/05A051; 64V0349/13A509; 64V0574/15A197; 64V0575/15A198;
64V0576/15A199; 64V0577/15A200; 64V0578/15A201; 64V0579/15A202; 64V0580/15A203

Table 2: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 prediction model.

C peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 98.24	high reactivity	positive
> 23.09 ≤ 98.24	moderate reactivity	positive
> 17.28 ≤ 23.09	low reactivity	positive
> 10.50 ≤ 17.28	no to low reactivity	borderline ²
≤ 10.50	minimal or no reactivity	negative

3.2. LIMITATIONS OF THE EVALUATION BY INSOLUBILITY AND GRAVIMETRIC PROCEDURE

For test substances that are not completely soluble by visual observation in the sample preparations containing the peptides immediately after preparation or after 24 hours, or when a gravimetric procedure is applied (with the exception of application of the undiluted test substance), the result may be under-predictive due to limited availability of the test substance. In this case mean peptide reactivity < 8.11% (Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model) or < 17.28% (Cysteine 1:10 prediction model) is interpreted as “inconclusive”. However, a mean peptide depletion > 8.11% or > 17.28% is considered as “positive”.

² The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 13.89 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 13.89 ≤ 23.09 as “positive” (low reactivity).

Summary report; Project Nos.:

64V0689/05A052; 64V0691/05A051; 64V0349/13A509; 64V0574/15A197; 64V0575/15A198; 64V0576/15A199;
64V0577/15A200; 64V0578/15A201; 64V0579/15A202; 64V0580/15A203

4. RESULTS

Table 3: Summary of results. 1) Negative values considered to be zero. 2) Evaluation according to cysteine 1:10 / lysine 1:50 model can be performed despite insolubility of Lys-samples due to the unambiguous lysine-depletion.

Test substance name	Project	Cysteine-Peptide			Lysine-Peptide			mean of both depletions [%] ¹⁾	prediction model used for evaluation	Result (reactivity class)	remark on result	Final result
		mean depletion [%]	SD [%]	Samples with peptide visually solved	mean depletion [%]	SD [%]	Samples with peptide visually solved					
1,6-Hexandiol-DGE (s0347)	64V0689/05A052	83.89	1.66	yes	15.94	0.36	yes	49.92	cysteine 1:10 / lysine 1:50	high	-	positive
C12/C14-Mono-GE	64V0691/05A051	4.84	0.25	no	-2.41	0.42	no	2.42	cysteine 1:10 / lysine 1:50	minimal or no reactivity	reactivity class could be under-predicted due to insolubility	inconclusive
Butyl glycidyl ether	64V0349/13A509	57.99	2.43	yes	9.73	0.44	yes	33.86	cysteine 1:10 / lysine 1:50	moderate	-	positive
2-Ethylhexyl-GE	64V0574/15A197	50.70	2.01	no	4.15	0.41	no	27.42	cysteine 1:10 / lysine 1:50	moderate	reactivity class could be under-predicted due to insolubility	positive
Phenyl-GE	64V0575/15A198	81.57	2.05	yes	12.64	0.48	yes	47.10	cysteine 1:10 / lysine 1:50	high	-	positive
o-Kresylglycidylether	64V0576/15A199	81.34	1.62	yes	100.00	0.00	no	90.67	cysteine 1:10 / lysine 1:50 ²⁾	high	-	positive
1,4-Butanol-DGE	64V0577/15A200	86.64	1.84	yes	18.21	0.62	yes	52.42	cysteine 1:10 / lysine 1:50	high	-	positive
Neopentylglykol-DGE	64V0578/15A201	71.48	2.52	yes	12.20	0.35	yes	41.84	cysteine 1:10 / lysine 1:50	moderate	-	positive
Polypropylenglykol-DGE	64V0579/15A202	51.21	2.14	yes	7.21	0.29	yes	29.21	cysteine 1:10 / lysine 1:50	moderate	-	positive
Trimethylolpropan-TGE	64V0580/15A203	88.19	1.34	yes	17.67	0.25	no	-	cysteine 1:10	moderate	-	positive

STUDY TITLE

Report

Butyl glycidyl ether
CAS No.: 2426-08-6In Vitro Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay
(DPRA Test)**TEST GUIDELINE(S)**

OECD 442C

AUTHOR(S)

B. Wareing B.Sc. (Study Director)

STUDY COMPLETION DATE

24 May 2016

TEST FACILITY

BASF SE

Experimental Toxicology and Ecology
67056 Ludwigshafen, Germany**TEST FACILITY PROJECT IDENTIFICATION**

Project No.: 64V0349/13A509

SPONSORForschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Klarastraße 63
79106 Freiburg, Germany

This document contains manufacturing and trade secrets of the Sponsor(s). It is the property of the Sponsor(s) and may be used only for that purpose for which it was intended by the Sponsor(s). Every other or additional use, exploitation, reproduction, publication or submission to other parties require the written permission of the Sponsor(s), with the exception of regulatory agencies acting within the limits of their administrative authority.

SIGNATURE PAGE

Study Director:

B. Wareing 24 May 2016

B. Wareing B.Sc.

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

Head of Experimental Toxicology and Ecology:

Prof. Dr. rer. nat. B. v. Ravenzwaay

Test Facility Management:

Dr. rer. nat. R. Landsiedel

Study director:

B. Wareing B. Sc.

Applied Alternative Methods:

B. Wareing B. Sc.

CONTENTS

TITLE PAGE

SIGNATURE PAGE

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

CONTENTS

1. SUMMARY
2. INTRODUCTION
 - 2.1. OBJECTIVES
 - 2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS
 - 2.3. TEST GUIDELINES
 - 2.4. TIME SCHEDULE
3. MATERIALS AND METHODS
 - 3.1. TEST ITEM
 - 3.2. TEST SYSTEM
 - 3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT
 - 3.4. CONTROLS
 - 3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION
 - 3.6. ANALYSES
 - 3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE
 - 3.7.1. Test substance solubility
 - 3.7.2. Preparation of peptide stock solutions
 - 3.7.2.1. Preparation of calibration samples
 - 3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples
 - 3.7.3. Preparation of the vehicle controls
 - 3.7.4. Preparation of the co-elution control
 - 3.7.5. Measurement of peptide concentrations
 - 3.8. DATA EVALUATION
 - 3.8.1. Calculation of the peptide concentrations
 - 3.8.2. Calculation of the peptide depletion
 - 3.9. ACCEPTANCE CRITERIA
 - 3.10. EVALUATION OF RESULTS
 - 3.10.1. Peptide depletion
 - 3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure
 - 3.11. HISTORIC CONTROL DATA
4. RESULTS
 - 4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE
 - 4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve
 - 4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile
 - 4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

4.2.	LYSINE-CONTAINING PEPTIDE
4.2.1.	Lysine-peptide calibration curve
4.2.2.	Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile
4.2.3.	Reaction with lysine-peptide
4.3.	SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES
4.4.	CO-ELUTION
4.5.	MEAN PEPTIDE DEPLETION
4.6.	HISTORIC CONTROL DATA
5.	CONCLUSION
6.	VALIDITY CRITERIA / REFERENCES
7.	LIST OF ABBREVIATIONS
APPENDIX	
SAMPLE CHROMATOGRAMS	
ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE	
Certificate of Analysis	

1. SUMMARY

The reactivity of **Butyl glycidyl ether, CAS No.: 2426-08-6**, towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides was evaluated in the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). For this purpose the test substance was incubated with synthetic peptides for ca. 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The test substance was dissolved at a 100 mM concentration in acetonitrile. Three samples of the test substance were incubated with each peptide in ratios of 1:10 (for C-peptide) or 1:50 (for K-peptide). Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides.

Further, a co-elution control was assessed in order to detect possible interference of the test substance with the peptides. The samples consisted of the test substance, vehicle and the respective peptide buffer but without peptide. Moreover the samples were analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm and the area ratio 220 nm/ 258 nm was calculated as a measure of peak purity.

The following results were obtained in the DPRA:

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were solutions. Visual observation after the 24-hour incubation time did not reveal precipitates in any samples of the test substance with the peptides.

No co-elution of test substance and peptides was noticed.

The mean C-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 57.99%. The mean K-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 9.73%.

Thus, the mean peptide depletion was calculated to be 33.86%.

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **Butyl glycidyl ether, CAS No.: 2426-08-6, shows a moderate chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

2. INTRODUCTION

2.1. OBJECTIVES

Chemical reactivity has been shown to be well associated with allergenic potency (Gerberick et al., 2007) and has been described as the molecular initiating event in the OECD adverse outcome pathway (OECD Publication No.168; ENV/JM/MONO(2012)10). Within this context measuring the amount of proteins with nucleophilic side chains such as cysteine or lysine residues after incubation with putative allergens serves as surrogate markers.

In the DPRA the reactivity of a test item (=test substance) towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides is evaluated. For this purpose the test substance is incubated with synthetic peptides for 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentration is determined thereafter by high performance liquid chromatography with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The peptide depletion of test-substance incubated samples is compared to the peptide depletion of the NC samples and expressed as relative peptide depletion.

Due to the complexity of the skin sensitization process a single in vitro assay is not sufficient to adequately assess this toxicological endpoint. Therefore, a combination of several methods addressing two major steps of the sensitization process: protein reactivity and activation of dendritic cells has been proposed in a strategy to assess the sensitizing potential (Bauch et al. 2012, Urbisch et al. 2015).

2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

2.3. TEST GUIDELINES

The study was conducted based on the following test guideline:

- OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

2.4. TIME SCHEDULE

Test dates:	Experimental starting date (1 st weighing of test substance for sample preparation)	22 Mar 2016
	Sample preparation (C- and K-peptide)	22 Mar 2016
	Experimental completion date (documentation of check of raw data)	13 May 2016

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. TEST ITEM

The test item (= test substance) was used with the given specifications of the producer (Sigma – Aldrich). No further analyses were conducted.

Name of test substance:	Butyl glycidyl ether
Test-substance No.:	13/0349-2
Batch identification:	BCBH4941V
CAS No.:	2426-08-6
Purity:	99.8 % (see Certificate of Analysis in the Appendix; used for calculation of 100 mM preparation).
Identity:	Confirmed (see Certificate of Analysis in the Appendix)
Homogeneity:	The test substance was homogeneous by visual inspection.
Date of expiry:	05 Jan 2017

ADDITIONAL TEST-SUBSTANCE INFORMATION

Physical state / color:	Liquid / colorless, clear
Molecular weight:	130.18 g/mol
Log Kow:	1.08 (calculated)
Proposed reaction mechanism for protein binding by OECD toolbox:	The OECD toolbox proposed the following reaction mechanism for protein binding for either the substance or its predicted metabolites (auto-oxidation, hydrolysis, and skin metabolism): nucleophilic substitution

3.2. TEST SYSTEM

Synthetic peptides: Cysteine- (C-) containing peptide:
Ac-RFAACAA-COOH (MW=751.9 g/mol)
Lysine- (K-) containing peptide:
Ac-RFAAKAA-COOH (MW=776.2 g/mol)
The peptides are custom material (Supplier: GenScript, Picataway, NJ, USA and/or RS Synthesis, Louisville KY, USA) containing phenylalanine to aid in detection and either cysteine or lysine as the reactive center.

3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT

HPLC: Liquid chromatograph Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000 consisting of the following modules:

Pump: HPG-3400RS

Autosampler: WPS-3000TSL

Column oven: TCC-3000

UV-Detector: DAD-3000

Column: ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 μ m with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)

HPLC mobile phase A: H₂O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V

HPLC mobile phase B: ACN/H₂O/TFA 950/50/0.85 V/V/V

Incubator: Midi 40 Incubator (Thermo Scientific)

pH meter: Readability +/- 0.1 pH units.
For adjusting pH-values of buffers.

Reagents for preparing for pH 7.5 phosphate buffer (used for solving C-containing peptide):
the buffers:

Sodium phosphate, monobasic monohydrate, CAS no. 10049-21-5
(e.g. Sigma-Aldrich S9638)

Sodium phosphate, dibasic heptahydrate, CAS no. 7782-85-6
(e.g. Sigma-Aldrich S9390)

for pH 10.2 ammonium acetate buffer (used for solving K-containing peptide):

Ammonium acetate, CAS no. 631-61-8
(e.g. Sigma-Aldrich 32301)

Ammonium hydroxide, 28% – 30%, CAS no. 1336-21-6
(e.g. Sigma-Aldrich 320145)

3.4. CONTROLS

Negative control (NC): vehicle control = acetonitrile

Positive control (PC): Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA; CAS-no. 97-90-5), prepared as a 50 mM solution in acetonitrile.

Co-elution control: Sample prepared of the respective peptide buffer and the test substance but without peptide.

3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION

The test substance solution was prepared on a weight per volume basis within 4 hours of performing the assay (preparation of samples).

Test-substance preparation: The test substance was prepared as a 100 mM solution in acetonitrile. After short stirring the test substance was soluble in the vehicle.

Vehicle: acetonitrile

Reason for the vehicle: The test substance was soluble in acetonitrile.

3.6. ANALYSES

Because the test-substance preparation was incubated with the peptide shortly after preparation, no analysis of the test substance in the vehicle was performed.

3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE

The test substance was dissolved in a suitable vehicle. Three samples of the test substance were incubated with each peptide. Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides. The remaining non-depleted peptide concentration was determined thereafter by HPLC with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

In addition calibration samples of known peptide concentration, prepared from the respective peptide stock solution used for test-substance incubation, were measured in parallel with the same analytical method.

3.7.1. Test substance solubility

Prior to the assay the solubility of the test substance was tested. A suitable non-reactive, water-miscible solvent which dissolves the test substance completely (no visible precipitation or cloudiness of the test-substance preparation) should be used. The preferred solvent was acetonitrile. When not soluble in acetonitrile solutions in water, isopropanol, acetone, propanol, methanol or mixtures of these solvents were tried.

3.7.2. Preparation of peptide stock solutions

Peptide stock solutions in a concentration of 0.667 mM were prepared in pH 7.5 phosphate buffer (C-containing peptide) or pH 10.2 ammonium acetate buffer (K-containing peptide). The peptide stock solution was used for preparing the calibration samples and the test-substance and control samples.

3.7.2.1. Preparation of calibration samples

The following calibration samples were prepared from the peptide stock solutions in 20% acetonitrile:buffer (= dilution buffer) using serial dilution:

Table 1: Calibration samples of DPRA.

	Calib. 1	Calib. 2	Calib. 3	Calib. 4	Calib. 5	Calib. 6	Dilution buffer
mM peptide	0.534	0.267	0.134	0.067	0.033	0.017	0.000

The analysis of the calibration samples was started before analysis of the test-substance samples.

3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples

The samples were prepared in triplicates for each peptide.

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

The samples were prepared in suitable tubes, capped tightly and incubated at 25°C ± 2.5°C in the dark for 24 +/- 2 hours. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period. The HPLC analysis of the batch of samples started about 24 hours after sample preparation and the analysis time itself did not exceed 30 hours.

3.7.3. Preparation of the vehicle controls

Several acetonitrile controls were prepared in triplicates in the same way as the test-substance samples described above but with acetonitrile instead of the test substance: One set (set A) was analyzed together with the calibration samples without incubation and serves as a performance control. Another three sets (two sets B and set C) were prepared and incubated with the samples. Sets B were placed at the very start and ending of the sample list and serve as stability control of the peptide over the analysis time. Set C was analyzed with the samples and serves for calculation of the peptide depletion of any chemical formulated in acetonitrile.

3.7.4. Preparation of the co-elution control

The co-elution control was prepared in the same way as the test-substance samples described above but without the peptide. Instead the respective peptide buffer was used. The samples were analyzed together with the calibration samples. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period.

3.7.5. Measurement of peptide concentrations

The analyses of the samples were performed via HPLC under the following conditions:

Table 2: HPLC conditions used for analysis of DPRA samples.

Column:	ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 µm with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)														
Eluent:	A: H2O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V B: ACN/H2O/TFA 950/50/0.85 V/V/V														
Flow:	0.50 mL/min														
Gradient:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>time [min]</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>8.1</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.1</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	time [min]	%B	0	5	8	20	8.1	90	10	90	10.1	5	16	5
time [min]	%B														
0	5														
8	20														
8.1	90														
10	90														
10.1	5														
16	5														
Wavelength:	220 nm and 258 nm														
Injection volume:	2 µL														
Software:	Dionex Chromeleon														

3.8. DATA EVALUATION

Table(s) and/or figure(s) of measured parameters presented in the report were produced using PC based tabular calculation software. The mean and individual data were not always rounded but the significant digits were produced by changing the display format. As a consequence, calculation of mean values using the individual data presented in the report will, in some instances, yield minor variations in value.

The integrated peak areas were transferred electronically into EXCEL data spreadsheets to carry out the necessary calculations.

Some test substances or reaction products may co-eluate with the peptides. In these cases where proper integration and calculation of peptide depletion was not possible, the result for the respective peptide is reported as interference.

When samples were additionally analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm, the area ratio 220 nm/ 258 nm may be calculated and serve as a measure of peak purity. The ratio of a pure peptide peak should be consistent over all samples (100% ± 10% of the mean of the vehicle controls). However, due to small peak areas calculation of the area ratio may not be possible for all samples.

3.8.1. Calculation of the peptide concentrations

For each peptide a calibration curve was generated from the measured peak areas of the calibration samples of known peptide concentration.

The peptide concentration of the samples was calculated with the respective calibration curve using linear regression (b = axis intercept; m = slope).

$$\text{Peptide concentration [mM]} = \frac{\text{peak area [mAU} \times s] - b}{m}$$

3.8.2. Calculation of the peptide depletion

The peptide depletion of a sample was calculated as follows:

$$\text{Peptide depletion of sample} = \left[1 - \frac{\text{peptide concentration of sample (mM)}}{\text{mean peptide concentration of NC (mM)}} \right] \times 100 \quad [\%]$$

The mean peptide depletion for each of the two peptides was calculated as the mean value of the three samples conducted for each peptide and test substance (C-containing and K-containing peptide depletion; example calculation for C-containing peptide):

$$\text{C - containing peptide depletion of a test substance [\%]} = \text{mean [C - containing peptide depletion of samples 1 - 3] [\%]}$$

When a negative value for C- or K-peptide depletion was obtained the value was considered zero for calculation of the mean peptide depletion.

The mean peptide depletion of a test substance was calculated as the mean value of C-containing peptide depletion and K-containing peptide depletion:

$$\text{Mean peptide depletion [\%]} = \frac{\text{C-containing peptide depletion [\%]} + \text{K-containing peptide depletion [\%]}}{2}$$

3.9. ACCEPTANCE CRITERIA

If any of the acceptance criteria mentioned below is not met, repetition of the test is considered. In the case of an unambiguous result the study director may decide that an experiment is valid despite a deviation of acceptance criteria. However, reasonable justification must then be given.

The standard calibration curve should have an $r^2 > 0.99$.

The negative control (vehicle control) samples of sets A and C should be 0.50 mM +/- 0.05 mM.

The CV of the nine vehicle controls B and C should be < 15%.

Since the mean peptide depletion for each peptide is determined from the mean of three single samples, the variability between these samples should be acceptably low (SD <14.9% for % cysteine depletion and <11.6% for % lysine depletion).

In addition, the positive control should cause depletion of both peptides comparable to historic data.

3.10. EVALUATION OF RESULTS

3.10.1. Peptide depletion

Chemical reactivity was determined by mean peptide depletion [%] and was rated as high, moderate, low, or minimal:

Table 3: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model.

Mean peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 42.47	high reactivity	positive
> 22.62 ≤ 42.47	moderate reactivity	positive
> 8.11 ≤ 22.62	low reactivity	positive
> 4.65 ≤ 8.11	no to low reactivity	borderline ¹
≤ 4.65	minimal or no reactivity	negative

In the case mean peptide depletion [%] cannot be determined due to invalid K-peptide depletion (e.g. insolubility of the K-peptide samples or interference in the samples of the K-peptide) but valid C-peptide depletion is available, evaluation is performed as follows:

Table 4: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 prediction model.

C peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 98.24	high reactivity	positive
> 23.09 ≤ 98.24	moderate reactivity	positive
> 17.28 ≤ 23.09	low reactivity	positive
> 10.50 ≤ 17.28	no to low reactivity	borderline ²
≤ 10.50	minimal or no reactivity	negative

¹ The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 6.38 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 6.38 ≤ 22.62 as “positive” (low reactivity).

² The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 13.89 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 13.89 ≤ 23.09 as “positive” (low reactivity).

3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure

For test substances that are not completely soluble by visual observation in the sample preparations containing the peptides immediately after preparation or after 24 hours, or when a gravimetric procedure is applied (with the exception of application of the undiluted test substance), the result may be under-predictive due to limited availability of the test substance. In this case mean peptide reactivity < 8.11% (Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model) or < 17.28% (Cysteine 1:10 prediction model) is interpreted as “inconclusive”. However, a mean peptide depletion > 8.11% or > 17.28% is considered as “positive”.

3.11. HISTORIC CONTROL DATA

Historic control values of negative and positive controls, gathered over an appropriate time period, are presented in section 4.6. These data demonstrate the reproducibility of results and robustness of the procedures. They are used to derive suitable acceptance criteria (see section 3.9) for the test system.

4. RESULTS

For sample chromatograms of the vehicle control, co-elution control and test-substance samples see Appendix.

4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE

4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
C: Calib. 1	0.534	721.2	17.1	42.2		
C: Calib. 2	0.267	357.9	8.7	41.1	Slope:	1343.7
C: Calib. 3	0.134	183.1	4.2	43.6	Axis intercept:	2.896
C: Calib. 4	0.067	101.1	n.a.	-	Correlation:	0.99987
C: Calib. 5	0.033	46.4	n.a.	-		
C: Calib. 6	0.017	23.2	n.a.	-		
C: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

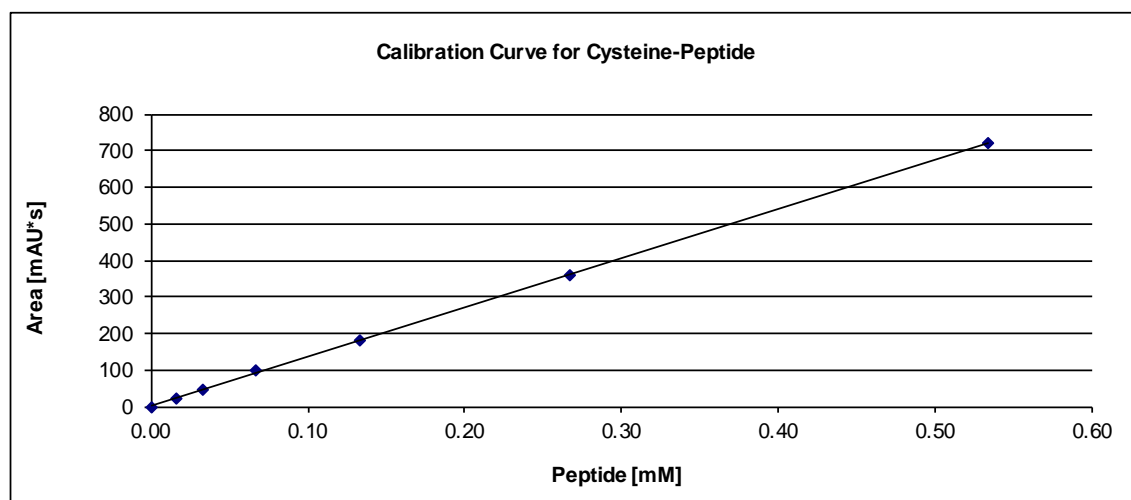


Figure 1: Calibration curve for Cysteine peptide

4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.491 mM with a SD of 0.009 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.475 mM with a SD of 0.002 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.478 mM with a SD of 0.002 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.4%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.1.3.

4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

Table 5: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	646.8	645.9	643.7	0.479	0.479	0.477	0.478	0.001
Butyl glycidyl ether	287.8	274.1	256.6	0.212	0.202	0.189	0.201	0.012
PC: EGDMA in ACN	354.8	339.4	327.6	0.262	0.250	0.242	0.251	0.010

Reaction with cysteine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	-0.21	-0.07	0.28	0.00	0.25
Butyl glycidyl ether	55.67	57.79	60.51	57.99	2.43
PC: EGDMA in ACN	45.23	47.63	49.47	47.45	2.12

Table 6: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	16.3	16.4	16.3	39.7	39.4	39.4
Butyl glycidyl ether	7.2	7.0	6.4	39.8	39.4	39.9
PC: EGDMA in ACN	8.8	8.5	8.2	40.4	39.8	40.1

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 39.6. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 99.3% to 100.8% of the mean of the vehicle controls.

4.2. LYSINE-CONTAINING PEPTIDE

4.2.1. Lysine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
K: Calib. 1	0.534	567.7	14.0	40.6		
K: Calib. 2	0.267	289.5	7.2	40.2	Slope:	1059.4
K: Calib. 3	0.134	148.3	n.a.	-	Axis intercept:	4.264
K: Calib. 4	0.067	80.1	n.a.	-	Correlation:	0.99986
K: Calib. 5	0.033	37.7	n.a.	-		
K: Calib. 6	0.017	20.3	n.a.	-		
K: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

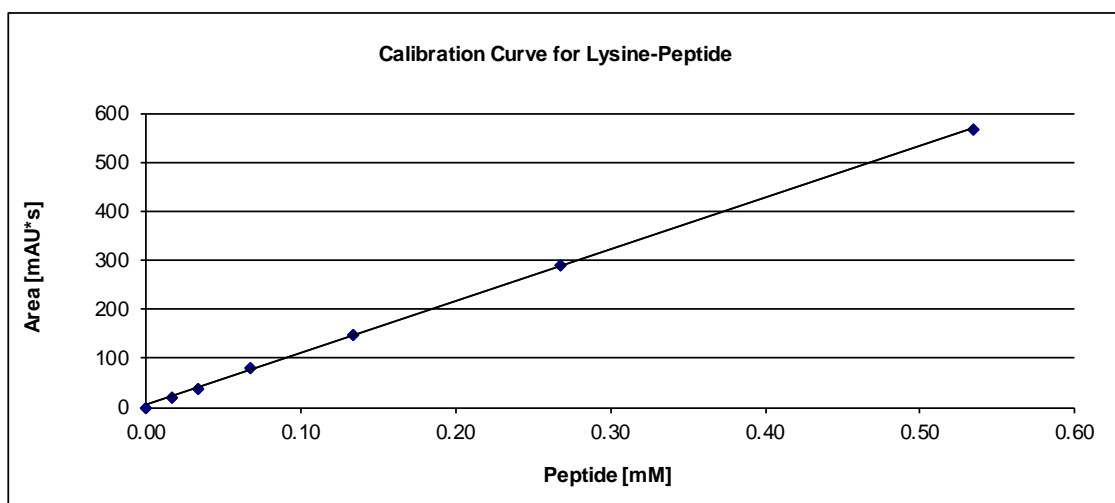


Figure 2: Calibration curve for Lysine peptide

4.2.2. Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.493 mM with a SD of 0.002 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.502 mM with a SD of 0.003 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.503 mM with a SD of 0.004 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.6%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.2.3.

4.2.3. Reaction with lysine-peptide

Table 7: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	536.4	535.2	530.5	0.502	0.501	0.497	0.500	0.003
Butyl glycidyl ether	479.9	484.2	483.4	0.449	0.453	0.452	0.451	0.002
PC: EGDMA in ACN	476.5	479.6	477.0	0.446	0.449	0.446	0.447	0.002

Reaction with lysine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	-0.44	-0.22	0.66	0.00	0.58
Butyl glycidyl ether	10.22	9.40	9.56	9.73	0.44
PC: EGDMA in ACN	10.86	10.27	10.77	10.63	0.32

Table 8: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	13.9	14.2	13.6	38.5	37.6	38.9
Butyl glycidyl ether	12.7	13.2	12.8	37.8	36.7	37.8
PC: EGDMA in ACN	13.2	13.3	13.1	36.1	36.1	36.5

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 38.9. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 94.2% to 97.2% of the mean of the vehicle controls.

4.3. SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were solutions. Visual observation after the 24-hour incubation time did not reveal precipitates in any samples of the test substance with the peptides.

4.4. CO-ELUTION

No co-elution of the test substance and peptides occurred as demonstrated by the consistent values of the area ratios 220 nm/258 nm (for values see sections 4.1.3 and 4.2.3) and chromatograms of the co-elution control in the Appendix.

4.5. MEAN PEPTIDE DEPLETION

The mean peptide depletion as average of cysteine- and lysine-peptide depletions is calculated and summarized in the table below.

Table 9: Mean peptide depletions of Cysteine, Lysine and both peptides.

	Cysteine-Peptide		Lysine-Peptide		mean of both depletions [%]
	mean depletion [%]	SD [%]	mean depletion [%]	SD [%]	
Butyl glycidyl ether	57.99	2.43	9.73	0.44	33.86
PC: EGDMA in ACN	47.45	2.12	10.63	0.32	29.04

4.6. HISTORIC CONTROL DATA

The acceptance criteria mentioned in section 3.9 were met.

The positive control caused depletion of both peptides is comparable to historic data as can be seen in the following tables:

Table 10: Historic control data of negative control / vehicle control.

Acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	K-peptide concentration [mM]
Min	0.447	0.451
Max	0.542	0.541
Mean	0.484	0.503
SD	0.017	0.014
n	49	51

Table 11: Historic control data of positive control.

EGDMA, 50 mM in acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	C-peptide depletion [%]	K-peptide concentration [mM]	K-peptide depletion [%]
Min	0.058	43.32	0.373	7.99
Max	0.282	88.30	0.489	25.24
Mean	0.211	56.36	0.429	15.27
SD	0.040	8.09	0.024	3.23
n		31		31

5. CONCLUSION

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **Butyl glycidyl ether, CAS No.: 2426-08-6, shows a moderate chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

6. VALIDITY CRITERIA / REFERENCES

Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Eltze 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(3):489-504.

Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittenvin JP. (2007) Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicological Sciences* 97(2), 417-427.

OECD 2012: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins (2012) OECD ENVIRONMENT, HEALTH AND SAFETY PUBLICATIONS: No.168; ENV/JM/MONO(2012)10
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en) last accessed 05 Feb 2013.

OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle SN, Landsiedel R, Jaworska J, Kern P, 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. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71(2), 135-352.

7. LIST OF ABBREVIATIONS

The following list contains abbreviations and definitions generally used in reports for this study type. This report will not necessarily use all expressions listed below.

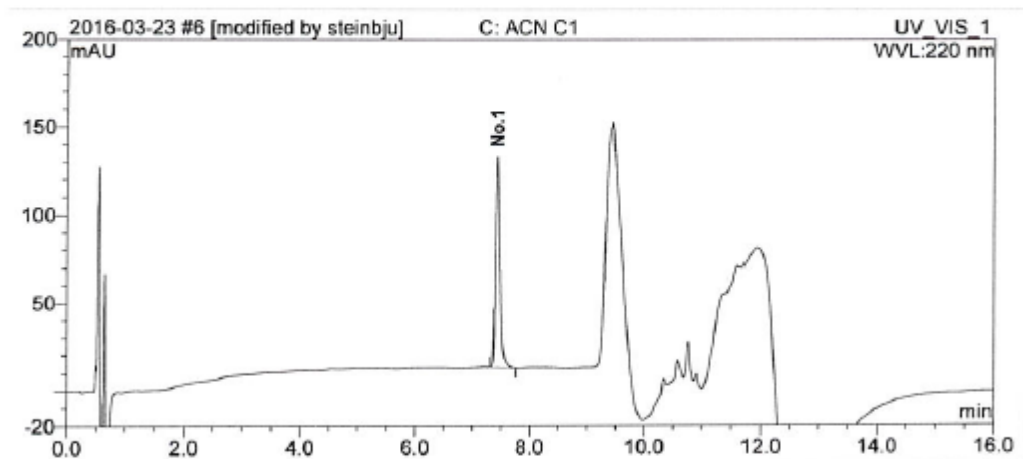
A	= alanine
AC	= acetone
Ac	= acetyl group
ACN	= acetonitrile
approx..	= approximately
C	= cysteine
ca.	= circa
Calib.	= calibration sample
cm	= centimeter
cm ²	= square centimeter
COOH	= carboxyl group
CV	= coefficient of variation
d	= day
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DTT	= dithiothreitol
EGDMA	= ethylene glycol dimethacrylate
F	= phenylalanine
G; g	= gram
h	= hour
IPA	= isopropyl alcohol (isopropanol)
K	= lysine
M	= mol / liter
mAU	= milli absorbance units
MeOH	= methanol
mg	= milligram
µg	= microgram
Min, min	= minute(s)
µL	= microliter
mL	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimol / liter
µm	= micrometer
MW	= Molecular weight

n.a.	= not assigned
NC	= negative control
No.; no.	= number
nm	= nanometer
p.a.	= per analysis
PC	= positive control
PrOH	= propanol
R	= arginine
SD	= standard deviation
SK	= co-elution control (Substanzkontrolle)
STD	= standard
TFA	= trifluoroacetic acid
UV	= ultraviolet
v/v	= volume / volume
Symbols:	
°C	= degree Celsius
~	= circa
=	= analogous
%	= per cent
∅	= diameter

APPENDIX

SAMPLE CHROMATOGRAMS

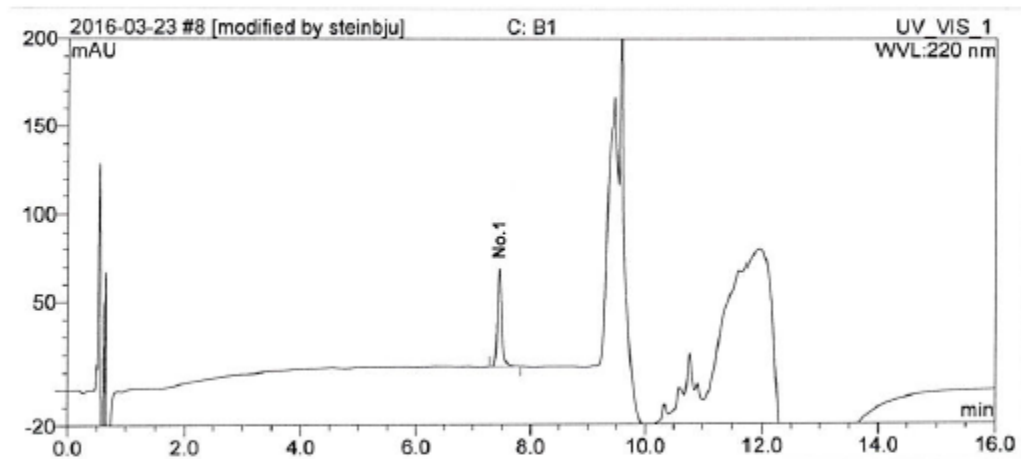
Sample Name:	C: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	23/03/16 11:47
Vial Number:	RA5	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	7.4275	646.809	119.418		100.0

Figure 3: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the C-containing peptide

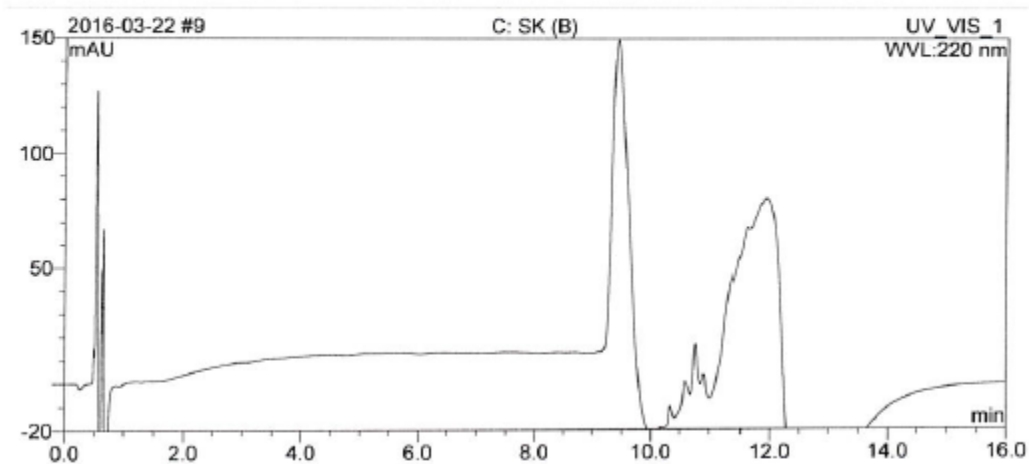
Sample Name:	C: B1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	23/03/16 12:21
Vial Number:	RA7	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	7.4467	287.774	55.452		100.0

Figure 4: Test substance incubated with the C-containing peptide

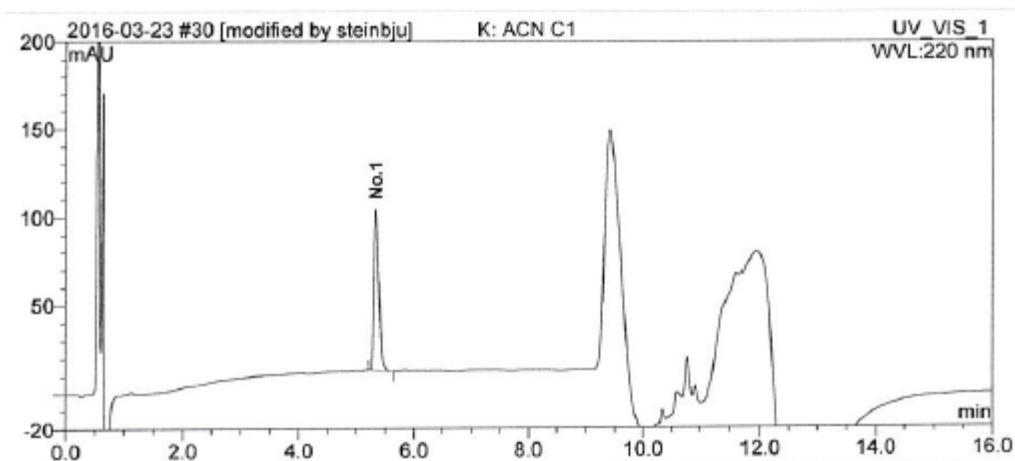
Sample Name:	C: SK (B)		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RA8	Recording Time:	22/03/16 13:32
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret. Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel. Area %
-----	---------------	------------	------------	----------------	-------------

Figure 5: Co-elution control (sample in pH 7.5 phosphate buffer)

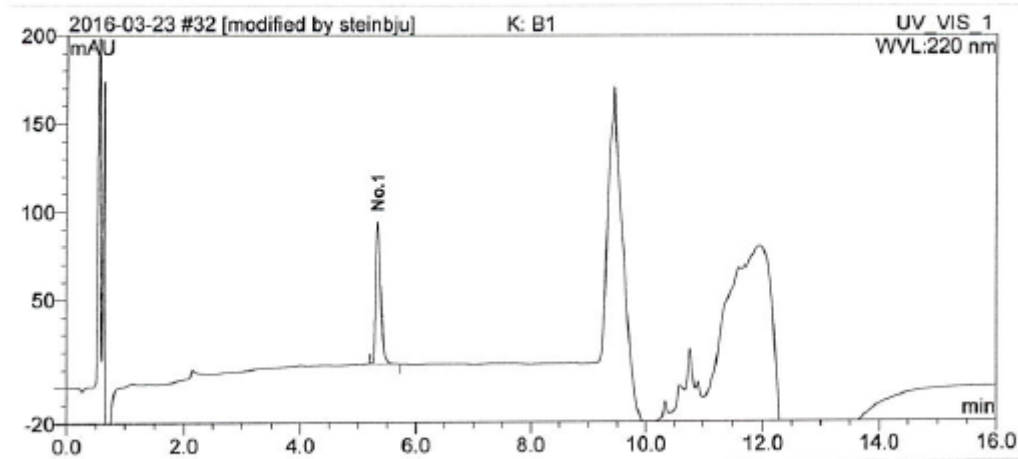
Sample Name:	K: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RD5	Recording Time:	23/03/16 18:32
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret. Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel. Area %
1	5.3317	536.365	90.916		100.0

Figure 6: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the K-containing peptide

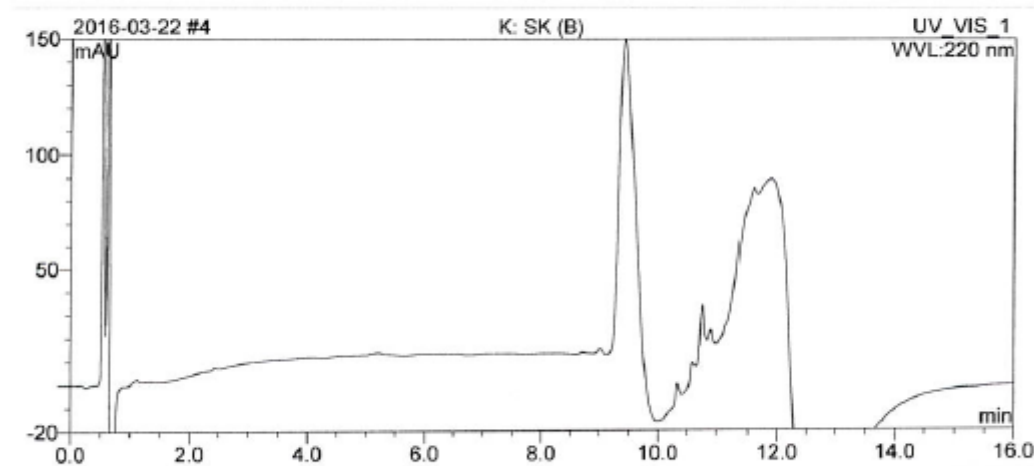
Sample Name:	K: B1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RD7	Recording Time:	23/03/16 19:06
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.3333	479.861	80.894		100.0

Figure 7: Test substance incubated with the K-containing peptide

Sample Name:	K: SK (B)		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RA3	Recording Time:	22/03/16 12:08
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.3333	479.861	80.894		100.0

Figure 8: Co-elution control (sample in pH 10.2 ammonium acetate buffer)

ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE

Certificate of Analysis

q 13/0349-2 added
06.01.16

SIGMA-ALDRICH

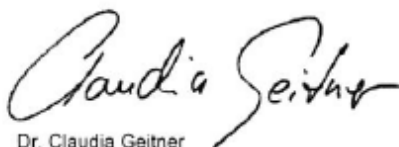
3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eutechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: BUTYL GLYCIDYL ETHER
95 %
Product Number: 377031
Product Brand: Aldrich
Molecular Formula: C₇H₁₄O₂
Molecular Mass: 130.18
CAS Number: 2426-08-6

TEST	SPECIFICATION	LOT BCBH4941V RESULTS
APPEARANCE	COLORLESS LIQUID	COLORLESS LIQUID
PURITY (GC AREA %)	94.0 % (MINIMUM)	99.8 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
REMARKS	--	REPLACES PRODUCT NUMBER B9778

QUALITY RELEASE DATE 23 FEB 2012



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

STUDY TITLE

Report

2-Ethylhexyl-GE
CAS No.: 2461-15-6In Vitro Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay
(DPRA Test)**TEST GUIDELINE(S)**

OECD 442C

AUTHOR(S)

B. Wareing B.Sc. (Study Director)

STUDY COMPLETION DATE

24 May 2016

TEST FACILITY

BASF SE

Experimental Toxicology and Ecology
67056 Ludwigshafen, Germany**TEST FACILITY PROJECT IDENTIFICATION**

Project No.: 64V0574/15A197

SPONSORForschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Klarastraße 63
79106 Freiburg, Germany

This document contains manufacturing and trade secrets of the Sponsor(s). It is the property of the Sponsor(s) and may be used only for that purpose for which it was intended by the Sponsor(s). Every other or additional use, exploitation, reproduction, publication or submission to other parties require the written permission of the Sponsor(s), with the exception of regulatory agencies acting within the limits of their administrative authority.

SIGNATURE PAGE

Study Director:

B. Wareing 24 May 2016
B. Wareing B.Sc.

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

Head of Experimental Toxicology and Ecology:

Prof. Dr. rer. nat. B. v. Ravenzwaay

Test Facility Management:

Dr. rer. nat. R. Landsiedel

Study director:

B. Wareing B.Sc.

Applied Alternative Methods:

B. Wareing B. Sc.

CONTENTS

TITLE PAGE

SIGNATURE PAGE

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

CONTENTS

1. SUMMARY
2. INTRODUCTION
 - 2.1. OBJECTIVES
 - 2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS
 - 2.3. TEST GUIDELINES
 - 2.4. TIME SCHEDULE
3. MATERIALS AND METHODS
 - 3.1. TEST ITEM
 - 3.2. TEST SYSTEM
 - 3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT
 - 3.4. CONTROLS
 - 3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION
 - 3.6. ANALYSES
 - 3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE
 - 3.7.1. Test substance solubility
 - 3.7.2. Preparation of peptide stock solutions
 - 3.7.2.1. Preparation of calibration samples
 - 3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples
 - 3.7.3. Preparation of the vehicle controls
 - 3.7.4. Preparation of the co-elution control
 - 3.7.5. Measurement of peptide concentrations
 - 3.8. DATA EVALUATION
 - 3.8.1. Calculation of the peptide concentrations
 - 3.8.2. Calculation of the peptide depletion
 - 3.9. ACCEPTANCE CRITERIA
 - 3.10. EVALUATION OF RESULTS
 - 3.10.1. Peptide depletion
 - 3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure
 - 3.11. HISTORIC CONTROL DATA
4. RESULTS
 - 4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE
 - 4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve

4.1.2.	Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile
4.1.3.	Reaction with cysteine-peptide
4.2.	LYSINE-CONTAINING PEPTIDE
4.2.1.	Lysine-peptide calibration curve
4.2.2.	Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile
4.2.3.	Reaction with lysine-peptide
4.3.	SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES
4.4.	CO-ELUTION
4.5.	MEAN PEPTIDE DEPLETION
4.6.	HISTORIC CONTROL DATA
5.	CONCLUSION
6.	VALIDITY CRITERIA / REFERENCES
7.	LIST OF ABBREVIATIONS
APPENDIX	
SAMPLE CHROMATOGRAMS	
ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE	
Certificate of Analysis	

1. SUMMARY

The reactivity of **2-Ethylhexyl-GE, CAS No.: 2461-15-6**, towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides was evaluated in the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). For this purpose the test substance was incubated with synthetic peptides for ca. 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The test substance was dissolved at a 100 mM concentration in acetonitrile. Three samples of the test substance were incubated with each peptide in ratios of 1:10 (for C-peptide) or 1:50 (for K-peptide). Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides.

Further, a co-elution control was assessed in order to detect possible interference of the test substance with the peptides. The samples consisted of the test substance, vehicle and the respective peptide buffer but without peptide. Moreover the samples were analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm and the area ratio 220 nm/ 258 nm was calculated as a measure of peak purity.

The following results were obtained in the DPRA:

The test substance was soluble in acetonitrile. The samples of the test substance with the C-peptide were solutions. However, after 24 hours minimal precipitates were noticed. The samples of the test substance with the K-peptide were emulsions at the time of preparation and after 24 hours. Thus all samples were centrifuged prior to HPLC analysis.

No co-elution of test substance and peptides was noticed.

The mean C-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 50.70%. The mean K-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 4.15%.

Thus, the mean peptide depletion was calculated to be 27.42%.

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **2-Ethylhexyl-GE, CAS No.: 2461-15-6, shows a moderate chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen. However, it should be noted that due to the limited solubility of the test substance the samples with both peptides were unsolved and that the result could therefore be under-predictive (see section 3.10.2).

2. INTRODUCTION

2.1. OBJECTIVES

Chemical reactivity has been shown to be well associated with allergenic potency (Gerberick et al., 2007) and has been described as the molecular initiating event in the OECD adverse outcome pathway (OECD Publication No.168; ENV/JM/MONO(2012)10). Within this context measuring the amount of proteins with nucleophilic side chains such as cysteine or lysine residues after incubation with putative allergens serves as surrogate markers.

In the DPRA the reactivity of a test item (=test substance) towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides is evaluated. For this purpose the test substance is incubated with synthetic peptides for 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentration is determined thereafter by high performance liquid chromatography with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The peptide depletion of test-substance incubated samples is compared to the peptide depletion of the NC samples and expressed as relative peptide depletion.

Due to the complexity of the skin sensitization process a single in vitro assay is not sufficient to adequately assess this toxicological endpoint. Therefore, a combination of several methods addressing two major steps of the sensitization process: protein reactivity and activation of dendritic cells has been proposed in a strategy to assess the sensitizing potential (Bauch et al. 2012, Urbisch et al. 2015).

2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

2.3. TEST GUIDELINES

The study was conducted based on the following test guideline:

- OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

2.4. TIME SCHEDULE

Test dates:	Experimental starting date (1 st weighing of test substance for sample preparation)	16 Mar 2016
	Sample preparation (C- and K-peptide)	16 Mar 2016
	Experimental completion date (documentation of check of raw data)	23 Mar 2016

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. TEST ITEM

The test item (= test substance) was used with the given specifications of the producer (Sigma – Aldrich). No further analyses were conducted.

Name of test substance:	2-Ethylhexyl-GE
Test-substance No.:	15/0574-1
Batch identification:	STBF3150V
CAS No.:	2461-15-6
Purity:	99.8 %, (see Certificate of Analysis in the Appendix; used for calculation of 100 mM preparation).
Identity:	Confirmed (see Certificate of Analysis in the Appendix)
Homogeneity:	The test substance was homogeneous by visual inspection.
Date of expiry:	05 Jan 2017

ADDITIONAL TEST-SUBSTANCE INFORMATION

Physical state / color:	Liquid / colorless, clear
Molecular weight:	186.29 g/mol
Log Kow:	2.94 (calculated)
Proposed reaction mechanism for protein binding by OECD toolbox:	The OECD toolbox proposed the following reaction mechanism for protein binding for either the substance or its predicted metabolites (auto-oxidation, hydrolysis, and skin metabolism): nucleophilic substitution

3.2. TEST SYSTEM

Synthetic peptides: Cysteine- (C-) containing peptide:
Ac-RFAACAA-COOH (MW=751.9 g/mol)
Lysine- (K-) containing peptide:
Ac-RFAAKAA-COOH (MW=776.2 g/mol)
The peptides are custom material (Supplier: GenScript, Picataway, NJ, USA and/or RS Synthesis, Louisville KY, USA) containing phenylalanine to aid in detection and either cysteine or lysine as the reactive center.

3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT

HPLC: Liquid chromatograph Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000 consisting of the following modules:

Pump: HPG-3400RS

Autosampler: WPS-3000TSL

Column oven: TCC-3000

UV-Detector: DAD-3000

Column: ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 μ m with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)

HPLC mobile phase A: H₂O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V

HPLC mobile phase B: ACN/H₂O/TFA 950/50/0.85 V/V/V

Incubator: Midi 40 Incubator (Thermo Scientific)

pH meter: Readability +/- 0.1 pH units.
For adjusting pH-values of buffers.

Reagents for preparing for pH 7.5 phosphate buffer (used for solving C-containing peptide):
the buffers:

Sodium phosphate, monobasic monohydrate, CAS no. 10049-21-5
(e.g. Sigma-Aldrich S9638)

Sodium phosphate, dibasic heptahydrate, CAS no. 7782-85-6
(e.g. Sigma-Aldrich S9390)

for pH 10.2 ammonium acetate buffer (used for solving K-containing peptide):

Ammonium acetate, CAS no. 631-61-8
(e.g. Sigma-Aldrich 32301)

Ammonium hydroxide, 28% – 30%, CAS no. 1336-21-6
(e.g. Sigma-Aldrich 320145)

3.4. CONTROLS

Negative control (NC): vehicle control = acetonitrile

Positive control (PC): Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA; CAS-no. 97-90-5), prepared as a 50 mM solution in acetonitrile.

Co-elution control: Sample prepared of the respective peptide buffer and the test substance but without peptide.

3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION

The test substance solution was prepared on a weight per volume basis within 4 hours of performing the assay (preparation of samples).

Test-substance preparation: The test substance was prepared as a 100 mM solution in acetonitrile. After short stirring the test substance was soluble in the vehicle.

Vehicle: acetonitrile

Reason for the vehicle: The test substance was soluble in acetonitrile.

3.6. ANALYSES

Because the test-substance preparation was incubated with the peptide shortly after preparation, no analysis of the test substance in the vehicle was performed.

3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE

The test substance was dissolved in a suitable vehicle. Three samples of the test substance were incubated with each peptide. Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides. The remaining non-depleted peptide concentration was determined thereafter by HPLC with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

In addition calibration samples of known peptide concentration, prepared from the respective peptide stock solution used for test-substance incubation, were measured in parallel with the same analytical method.

3.7.1. Test substance solubility

Prior to the assay the solubility of the test substance was tested. A suitable non-reactive, water-miscible solvent which dissolves the test substance completely (no visible precipitation or cloudiness of the test-substance preparation) should be used. The preferred solvent was acetonitrile. When not soluble in acetonitrile solutions in water, isopropanol, acetone, propanol, methanol or mixtures of these solvents were tried.

3.7.2. Preparation of peptide stock solutions

Peptide stock solutions in a concentration of 0.667 mM were prepared in pH 7.5 phosphate buffer (C-containing peptide) or pH 10.2 ammonium acetate buffer (K-containing peptide). The peptide stock solution was used for preparing the calibration samples and the test-substance and control samples.

3.7.2.1. Preparation of calibration samples

The following calibration samples were prepared from the peptide stock solutions in 20% acetonitrile:buffer (= dilution buffer) using serial dilution:

Table 1: Calibration samples of DPRA.

	Calib. 1	Calib. 2	Calib. 3	Calib. 4	Calib. 5	Calib. 6	Dilution buffer
mM peptide	0.534	0.267	0.134	0.067	0.033	0.017	0.000

The analysis of the calibration samples was started before analysis of the test-substance samples.

3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples

The samples were prepared in triplicates for each peptide.

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

The samples were prepared in suitable tubes, capped tightly and incubated at 25°C ± 2.5°C in the dark for 24 +/- 2 hours. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period. As the samples were visually turbid or displayed precipitates they were centrifuged / filtrated prior to injection into the HPLC in order to remove any unsolved particles.

3.7.3. Preparation of the vehicle controls

Several acetonitrile controls were prepared in triplicates in the same way as the test-substance samples described above but with acetonitrile instead of the test substance: One set (set A) was analyzed together with the calibration samples without incubation and serves as a performance control. Another three sets (two sets B and set C) were prepared and incubated with the samples. Sets B were placed at the very start and ending of the sample list and serve as stability control of the peptide over the analysis time. Set C was analyzed with the samples and serves for calculation of the peptide depletion of any chemical formulated in acetonitrile.

3.7.4. Preparation of the co-elution control

The co-elution control was prepared in the same way as the test-substance samples described above but without the peptide. Instead the respective peptide buffer was used. The samples were analyzed together with the calibration samples. As the samples were visually turbid or displayed precipitates (K-peptide samples, only) they were centrifuged / filtered prior to injection into the HPLC in order to remove any unsolved particles.

3.7.5. Measurement of peptide concentrations

The analyses of the samples were performed via HPLC under the following conditions:

Table 2: HPLC conditions used for analysis of DPRA samples.

Column:	ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 µm with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)														
Eluent:	A: H2O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V B: ACN/H2O/TFA 950/50/0.85 V/V/V														
Flow:	0.50 mL/min														
Gradient:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>time [min]</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>8.1</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.1</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	time [min]	%B	0	5	8	20	8.1	90	10	90	10.1	5	16	5
time [min]	%B														
0	5														
8	20														
8.1	90														
10	90														
10.1	5														
16	5														
Wavelength:	220 nm and 258 nm														
Injection volume:	2 µL														
Software:	Dionex Chromeleon														

3.8. DATA EVALUATION

Table(s) and/or figure(s) of measured parameters presented in the report were produced using PC based tabular calculation software. The mean and individual data were not always rounded but the significant digits were produced by changing the display format. As a consequence, calculation of mean values using the individual data presented in the report will, in some instances, yield minor variations in value.

The integrated peak areas were transferred electronically into EXCEL data spreadsheets to carry out the necessary calculations.

Some test substances or reaction products may co-eluate with the peptides. In these cases where proper integration and calculation of peptide depletion was not possible, the result for the respective peptide is reported as interference.

When samples were additionally analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm, the area ratio 220 nm/ 258 nm may be calculated and serve as a measure of peak purity. The ratio of a pure peptide peak should be consistent over all samples (100% ± 10% of the mean of the vehicle controls). However, due to small peak areas calculation of the area ratio may not be possible for all samples.

3.8.1. Calculation of the peptide concentrations

For each peptide a calibration curve was generated from the measured peak areas of the calibration samples of known peptide concentration.

The peptide concentration of the samples was calculated with the respective calibration curve using linear regression (b = axis intercept; m = slope).

$$\text{Peptide concentration [mM]} = \frac{\text{peak area [mAU} \times s] - b}{m}$$

3.8.2. Calculation of the peptide depletion

The peptide depletion of a sample was calculated as follows:

$$\text{Peptide depletion of sample} = \left[1 - \frac{\text{peptide concentration of sample (mM)}}{\text{mean peptide concentration of NC (mM)}} \right] \times 100 \quad [\%]$$

The mean peptide depletion for each of the two peptides was calculated as the mean value of the three samples conducted for each peptide and test substance (C-containing and K-containing peptide depletion; example calculation for C-containing peptide):

$$\text{C - containing peptide depletion of a test substance [\%]} = \text{mean [C - containing peptide depletion of samples 1 - 3] [\%]}$$

When a negative value for C- or K-peptide depletion was obtained the value was considered zero for calculation of the mean peptide depletion.

The mean peptide depletion of a test substance was calculated as the mean value of C-containing peptide depletion and K-containing peptide depletion:

$$\text{Mean peptide depletion [\%]} = \frac{\text{C-containing peptide depletion [\%]} + \text{K-containing peptide depletion [\%]}}{2}$$

3.9. ACCEPTANCE CRITERIA

If any of the acceptance criteria mentioned below is not met, repetition of the test is considered. In the case of an unambiguous result the study director may decide that an experiment is valid despite a deviation of acceptance criteria. However, reasonable justification must then be given.

The standard calibration curve should have an $r^2 > 0.99$.

The negative control (vehicle control) samples of sets A and C should be 0.50 mM +/- 0.05 mM.

The CV of the nine vehicle controls B and C should be < 15%.

Since the mean peptide depletion for each peptide is determined from the mean of three single samples, the variability between these samples should be acceptably low (SD <14.9% for % cysteine depletion and <11.6% for % lysine depletion).

In addition, the positive control should cause depletion of both peptides comparable to historic data.

3.10. EVALUATION OF RESULTS

3.10.1. Peptide depletion

Chemical reactivity was determined by mean peptide depletion [%] and was rated as high, moderate, low, or minimal:

Table 3: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model.

Mean peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 42.47	high reactivity	positive
> 22.62 ≤ 42.47	moderate reactivity	positive
> 8.11 ≤ 22.62	low reactivity	positive
> 4.65 ≤ 8.11	no to low reactivity	borderline ¹
≤ 4.65	minimal or no reactivity	negative

In the case mean peptide depletion [%] cannot be determined due to invalid K-peptide depletion (e.g. insolubility of the K-peptide samples or interference in the samples of the K-peptide) but valid C-peptide depletion is available, evaluation is performed as follows:

Table 4: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 prediction model.

C peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 98.24	high reactivity	positive
> 23.09 ≤ 98.24	moderate reactivity	positive
> 17.28 ≤ 23.09	low reactivity	positive
> 10.50 ≤ 17.28	no to low reactivity	borderline ²
≤ 10.50	minimal or no reactivity	negative

¹ The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 6.38 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 6.38 ≤ 22.62 as “positive” (low reactivity).

² The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 13.89 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 13.89 ≤ 23.09 as “positive” (low reactivity).

3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure

For test substances that are not completely soluble by visual observation in the sample preparations containing the peptides immediately after preparation or after 24 hours, or when a gravimetric procedure is applied (with the exception of application of the undiluted test substance), the result may be under-predictive due to limited availability of the test substance. In this case mean peptide reactivity < 8.11% (Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model) or < 17.28% (Cysteine 1:10 prediction model) is interpreted as “inconclusive”. However, a mean peptide depletion > 8.11% or > 17.28% is considered as “positive”.

3.11. HISTORIC CONTROL DATA

Historic control values of negative and positive controls, gathered over an appropriate time period, are presented in section 4.6. These data demonstrate the reproducibility of results and robustness of the procedures. They are used to derive suitable acceptance criteria (see section 3.9) for the test system.

4. RESULTS

For sample chromatograms of the vehicle control, co-elution control and test-substance samples see Appendix.

4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE

4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
C: Calib. 1	0.534	688.9	17.5	39.3		
C: Calib. 2	0.267	356.4	8.7	41.1	Slope:	1292.5
C: Calib. 3	0.134	186.9	4.5	41.9	Axis intercept:	4.353
C: Calib. 4	0.067	90.6	n.a.	-	Correlation:	0.99970
C: Calib. 5	0.033	44.9	n.a.	-		
C: Calib. 6	0.017	21.6	n.a.	-		
C: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

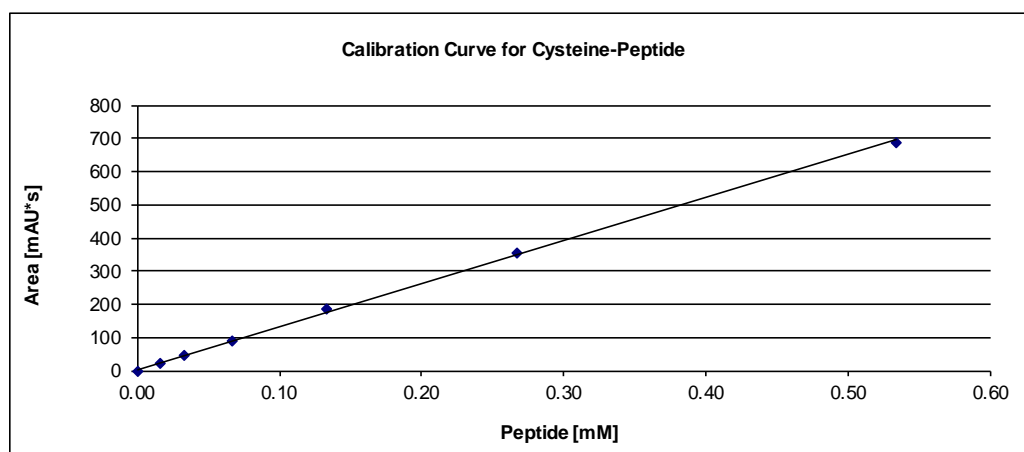


Figure 1: Calibration curve for Cysteine peptide

4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.501 mM with a SD of 0.002 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.497 mM with a SD of 0.005 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.494 mM with a SD of 0.006 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.9%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.1.3.

4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

Table 5: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	650.3	645.1	646.3	0.500	0.496	0.497	0.497	0.002
2-Ethylhexyl-GE	334.1	321.6	308.3	0.255	0.245	0.235	0.245	0.010
PC: EGDMA in ACN	352.9	337.9	322.9	0.270	0.258	0.246	0.258	0.012

Reaction with cysteine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	-0.48	0.34	0.14	0.00	0.43
2-Ethylhexyl-GE	48.70	50.65	52.73	50.70	2.01
PC: EGDMA in ACN	45.79	48.12	50.45	48.12	2.33

Table 6: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	16.4	16.3	16.4	39.7	39.5	39.5
2-Ethylhexyl-GE	8.6	7.9	7.7	39.1	40.8	40.1
PC: EGDMA in ACN	9.0	8.6	8.2	39.3	39.3	39.5

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 39.4. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 99.2% to 103.7% of the mean of the vehicle controls.

4.2. LYSINE-CONTAINING PEPTIDE

4.2.1. Lysine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
K: Calib. 1	0.534	556.1	14.3	39.0		
K: Calib. 2	0.267	285.9	7.3	39.2	Slope:	1040.6
K: Calib. 3	0.134	146.9	n.a.	-	Axis intercept:	3.598
K: Calib. 4	0.067	71.8	n.a.	-	Correlation:	0.99987
K: Calib. 5	0.033	38.3	n.a.	-		
K: Calib. 6	0.017	20.1	n.a.	-		
K: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

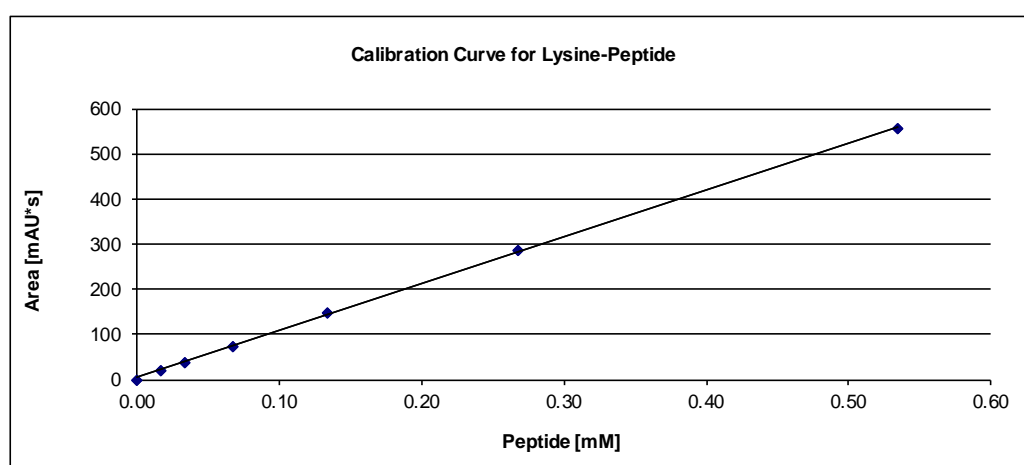


Figure 2: Calibration curve for Lysine peptide

4.2.2. Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.521 mM with a SD of 0.004 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.503 mM with a SD of 0.004 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.504 mM with a SD of 0.003 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 1.1%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.2.3.

4.2.3. Reaction with lysine-peptide

Table 7: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	527.6	542.2	527.9	0.504	0.518	0.504	0.508	0.008
2-Ethylhexyl-GE	512.2	511.6	508.1	0.489	0.488	0.485	0.487	0.002
PC: EGDMA in ACN	471.6	470.4	471.7	0.450	0.449	0.450	0.449	0.001

Reaction with lysine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	0.94	-1.82	0.88	0.00	1.58
2-Ethylhexyl-GE	3.85	3.98	4.62	4.15	0.41
PC: EGDMA in ACN	11.53	11.77	11.51	11.60	0.14

Table 8: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	12.7	12.5	12.8	41.7	43.3	41.1
2-Ethylhexyl-GE	13.1	13.2	13.2	39.1	38.7	38.5
PC: EGDMA in ACN	11.9	11.9	11.9	39.6	39.4	39.5

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 40.4. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 95.2% to 96.8% of the mean of the vehicle controls.

4.3. SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were solutions (C-peptide) or emulsions (K-peptide).

Visual observation after the 24-hour incubation time revealed minimal precipitation in the samples of the test substance with the C-peptide and emulsions in the samples with the K-peptide.

4.4. CO-ELUTION

No co-elution of the test substance and peptides occurred as demonstrated by the consistent values of the area ratios 220 nm/258 nm (for values see sections 4.1.3 and 4.2.3) and chromatograms of the co-elution control in the Appendix.

4.5. MEAN PEPTIDE DEPLETION

The mean peptide depletion as average of cysteine- and lysine-peptide depletions is calculated and summarized in the table below.

Table 9: Mean peptide depletions of Cysteine, Lysine and both peptides.

	Cysteine-Peptide		Lysine-Peptide		mean of both depletions [%]
	mean depletion [%]	SD [%]	mean depletion [%]	SD [%]	
2-Ethylhexyl-GE	50.70	2.01	4.15	0.41	27.42
PC: EGDMA in ACN	48.12	2.33	11.60	0.14	29.86

4.6. HISTORIC CONTROL DATA

The acceptance criteria mentioned in section 3.9 were met.

The positive control caused depletion of both peptides is comparable to historic data as can be seen in the following tables:

Table 10: Historic control data of negative control / vehicle control.

Acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	K-peptide concentration [mM]
Min	0.447	0.451
Max	0.542	0.541
Mean	0.484	0.503
SD	0.017	0.014
n	49	51

Table 11: Historic control data of positive control.

EGDMA, 50 mM in acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	C-peptide depletion [%]	K-peptide concentration [mM]	K-peptide depletion [%]
Min	0.058	43.32	0.373	7.99
Max	0.282	88.30	0.489	25.24
Mean	0.211	56.36	0.429	15.27
SD	0.040	8.09	0.024	3.23
n		31		31

5. CONCLUSION

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **2-Ethylhexyl-GE, CAS No.: 2461-15-6 shows a moderate chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen. However, it should be noted that due to the limited solubility of the test substance the samples with both peptides were unsolved and that the result could therefore be under-predictive (see section 3.10.2).

6. VALIDITY CRITERIA / REFERENCES

Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Eltze 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(3):489-504.

Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittenvin JP. (2007) Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicological Sciences* 97(2), 417-427.

OECD 2012: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins (2012) OECD ENVIRONMENT, HEALTH AND SAFETY PUBLICATIONS: No.168; ENV/JM/MONO(2012)10
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en) last accessed 05 Feb 2013.

OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle SN, Landsiedel R, Jaworska J, Kern P, 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. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71(2), 135-352.

7. LIST OF ABBREVIATIONS

The following list contains abbreviations and definitions generally used in reports for this study type. This report will not necessarily use all expressions listed below.

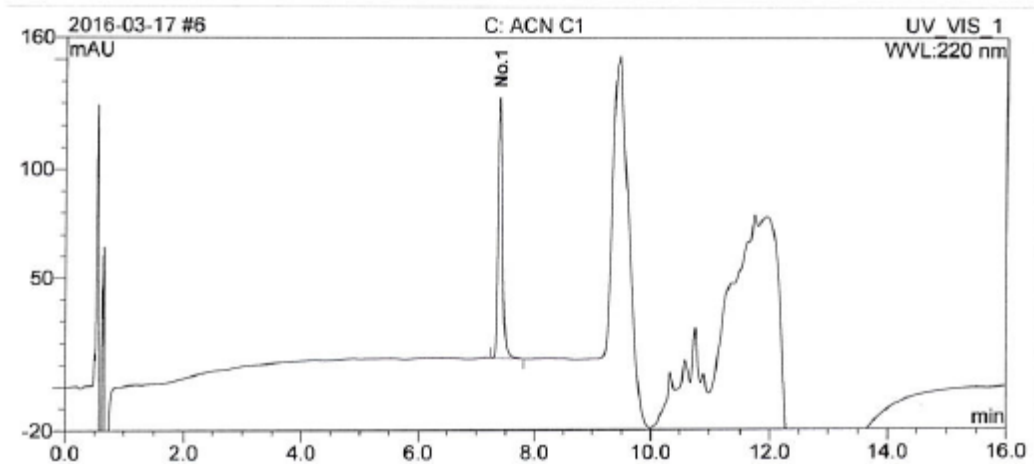
A	= alanine
AC	= acetone
Ac	= acetyl group
ACN	= acetonitrile
approx..	= approximately
C	= cysteine
ca.	= circa
Calib.	= calibration sample
cm	= centimeter
cm ²	= square centimeter
COOH	= carboxyl group
CV	= coefficient of variation
d	= day
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DTT	= dithiothreitol
EGDMA	= ethylene glycol dimethacrylate
F	= phenylalanine
G; g	= gram
h	= hour
IPA	= isopropyl alcohol (isopropanol)
K	= lysine
M	= mol / liter
mAU	= milli absorbance units
MeOH	= methanol
mg	= milligram
µg	= microgram
Min, min	= minute(s)
µL	= microliter
mL	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimol / liter
µm	= micrometer
MW	= Molecular weight

n.a.	= not assigned
NC	= negative control
No.; no.	= number
nm	= nanometer
p.a.	= per analysis
PC	= positive control
PrOH	= propanol
R	= arginine
SD	= standard deviation
SK	= co-elution control (Substanzkontrolle)
STD	= standard
TFA	= trifluoroacetic acid
UV	= ultraviolet
v/v	= volume / volume
Symbols:	
°C	= degree Celsius
~	= circa
=	= analogous
%	= per cent
∅	= diameter

APPENDIX

SAMPLE CHROMATOGRAMS

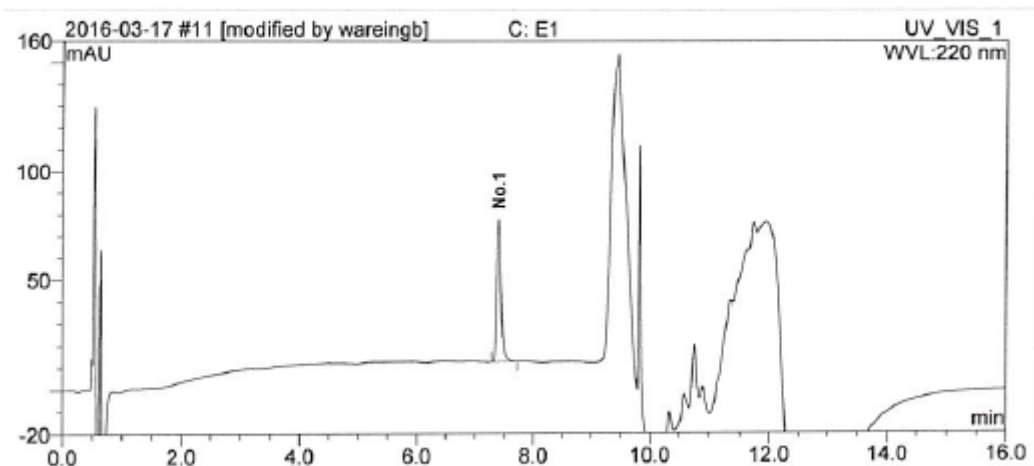
Sample Name:	C: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RA5	Recording Time:	17/03/16 12:20
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	7.3875	650.306	119.438		100.0

Figure 3: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the C-containing peptide

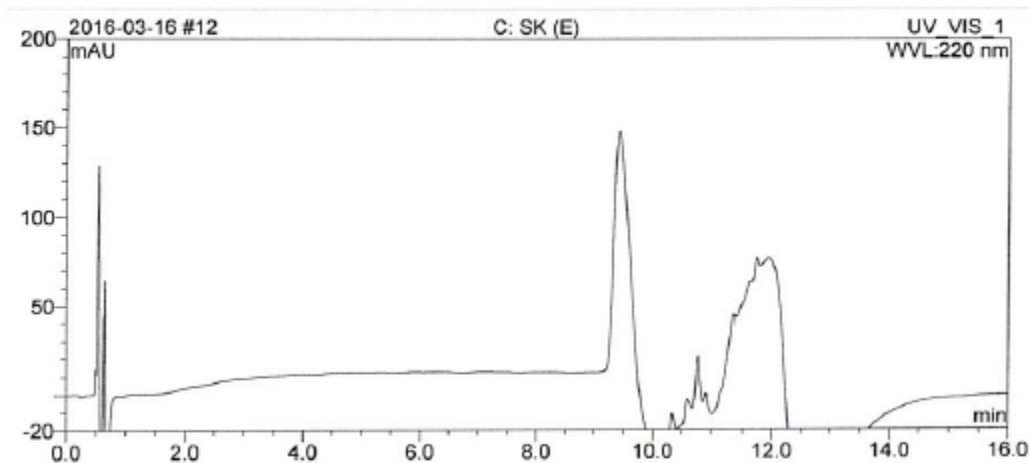
Sample Name:	C: E1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RB2	Recording Time:	17/03/16 13:45
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	7.4042	334.121	64.859		100.0

Figure 4: Test substance incubated with the C-containing peptide

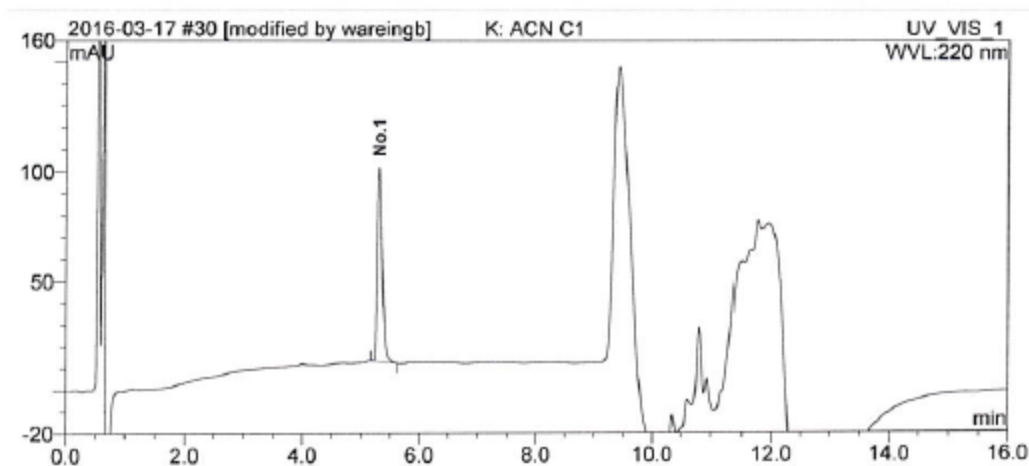
Sample Name:	C: SK (E)		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	16/03/16 15:16
Vial Number:	RB3	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method: Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
-----	--------------	------------	------------	----------------	------------

Figure 5: Co-elution control (sample in pH 7.5 phosphate buffer)

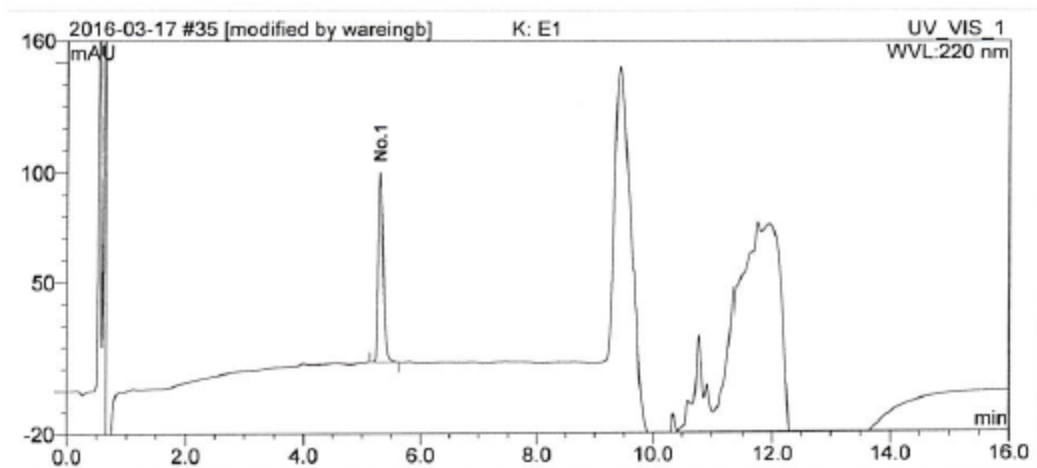
Sample Name:	K: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	17/03/16 19:05
Vial Number:	RD5	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method: Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.3050	527.602	89.001		100.0

Figure 6: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the K-containing peptide

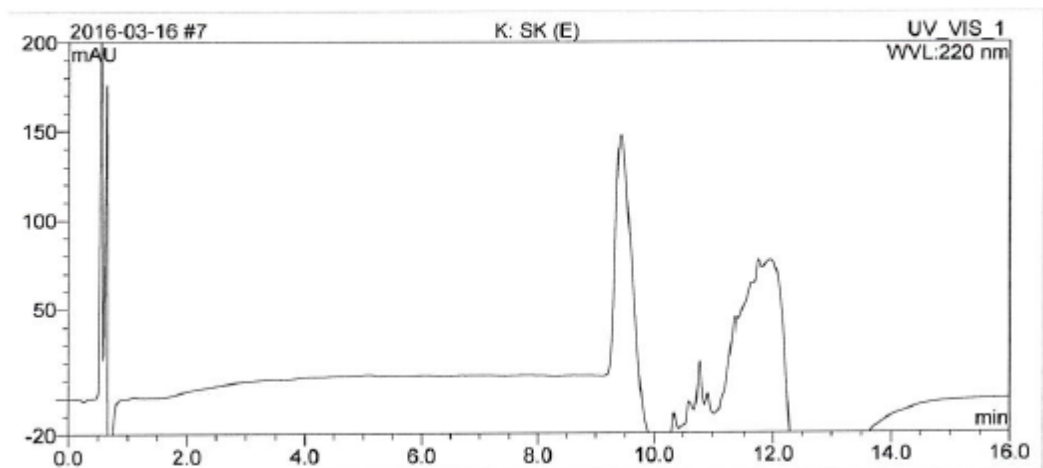
Sample Name:	K: E1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RE2	Recording Time:	17/03/16 20:30
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.3033	512.229	87.083		100.0

Figure 7: Test substance incubated with the K-containing peptide

Sample Name:	K: SK (E)		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RA6	Recording Time:	16/03/16 13:52
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.3033	512.229	87.083		100.0

Figure 8: Co-elution control (sample in pH 10.2 ammonium acetate buffer)

ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE

Certificate of Analysis

15/0574-1 *

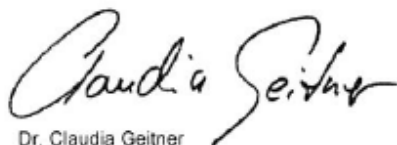
* added 06.01.16 RW

SIGMA-ALDRICH3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: 2-ETHYLHEXYL GLYCIDYL ETHER
98 %
Product Number: 251747
Batch Number: STBF3150V
Brand: Aldrich
CAS Number: 2461-15-6
Formula: C₁₁H₂₂O₂
Formula Weight: 186.29
Quality Release Date: 12 DEC 2014

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS	COLORLESS
APPEARANCE (FORM)	LIQUID	LIQUID
PURITY (GC AREA %)	≥ 97.5 %	99.8 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Steinheim, Germany

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

STUDY TITLE

Report

C12/C14-Mono-GE
CAS No.: 68609-97-2In Vitro Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay
(DPRA Test)**TEST GUIDELINE(S)**

OECD 442C

AUTHOR(S)

B. Wareing B.Sc. (Study Director)

STUDY COMPLETION DATE

24 May 2016

TEST FACILITY

BASF SE

Experimental Toxicology and Ecology
67056 Ludwigshafen, Germany**TEST FACILITY PROJECT IDENTIFICATION**

Project No.: 64V0691/05A051

SPONSORForschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Klarastraße 63
79106 Freiburg, Germany

This document contains manufacturing and trade secrets of the Sponsor(s). It is the property of the Sponsor(s) and may be used only for that purpose for which it was intended by the Sponsor(s). Every other or additional use, exploitation, reproduction, publication or submission to other parties require the written permission of the Sponsor(s), with the exception of regulatory agencies acting within the limits of their administrative authority.

SIGNATURE PAGE

Study Director:

B. Wareing 24 May 2016
B. Wareing B.Sc.

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

Head of Experimental Toxicology and Ecology:

Prof. Dr. rer. nat. B. v. Ravenzwaay

Test Facility Management:

Dr. rer. nat. R. Landsiedel

Study director:

B. Wareing B.Sc.

Applied Alternative Methods:

B. Wareing B. Sc.

CONTENTS

TITLE PAGE

SIGNATURE PAGE

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

CONTENTS

1. SUMMARY
2. INTRODUCTION
 - 2.1. OBJECTIVES
 - 2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS
 - 2.3. TEST GUIDELINES
 - 2.4. TIME SCHEDULE
3. MATERIALS AND METHODS
 - 3.1. TEST ITEM
 - 3.2. TEST SYSTEM
 - 3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT
 - 3.4. CONTROLS
 - 3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION
 - 3.6. ANALYSES
 - 3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE
 - 3.7.1. Test substance solubility
 - 3.7.2. Preparation of peptide stock solutions
 - 3.7.2.1. Preparation of calibration samples
 - 3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples
 - 3.7.3. Preparation of the vehicle controls
 - 3.7.4. Preparation of the co-elution control
 - 3.7.5. Measurement of peptide concentrations
 - 3.8. DATA EVALUATION
 - 3.8.1. Calculation of the peptide concentrations
 - 3.8.2. Calculation of the peptide depletion
 - 3.9. ACCEPTANCE CRITERIA
 - 3.10. EVALUATION OF RESULTS
 - 3.10.1. Peptide depletion
 - 3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure
 - 3.11. HISTORIC CONTROL DATA
4. RESULTS
 - 4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE
 - 4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve
 - 4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile
 - 4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

4.2.	LYSINE-CONTAINING PEPTIDE
4.2.1.	Lysine-peptide calibration curve
4.2.2.	Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile
4.2.3.	Reaction with lysine-peptide
4.3.	SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES
4.4.	CO-ELUTION
4.5.	MEAN PEPTIDE DEPLETION
4.6.	HISTORIC CONTROL DATA
5.	CONCLUSION
6.	VALIDITY CRITERIA / REFERENCES
7.	LIST OF ABBREVIATIONS
APPENDIX	
SAMPLE CHROMATOGRAMS	
ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE	
Certificate of Analysis	

1. SUMMARY

The reactivity of **C12/C14-Mono-GE, CAS No.: 68609-97-2**, towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides was evaluated in the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). For this purpose the test substance was incubated with synthetic peptides for ca. 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The test substance was dissolved at a 100 mM concentration in acetonitrile. Three samples of the test substance were incubated with each peptide in ratios of 1:10 (for C-peptide) or 1:50 (for K-peptide). Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides.

Further, a co-elution control was assessed in order to detect possible interference of the test substance with the peptides. The samples consisted of the test substance, vehicle and the respective peptide buffer but without peptide. Moreover the samples were analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm and the area ratio 220 nm/ 258 nm was calculated as a measure of peak purity.

The following results were obtained in the DPRA:

The test substance was soluble in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were emulsions at the time of preparation and after 24 hours. Thus all samples were centrifuged prior to HPLC analysis.

No co-elution of test substance and peptides was noticed.

The mean C-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 4.84%. The mean K-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be -2.41%.

Negative depletions were considered to be “zero” for calculation of the mean peptide depletion, which was thus calculated to be 2.42%.

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **C12/C14-Mono-GE, CAS No.: 68609-97-2, shows a minimal chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen. However, it should be noted that due to the limited solubility of the test substance the samples with both peptides were emulsions and that the result could therefore be under-predictive. Following OECD TG 442C a “negative” result should be considered “**inconclusive**” in this case (see section 3.10.2).

2. INTRODUCTION

2.1. OBJECTIVES

Chemical reactivity has been shown to be well associated with allergenic potency (Gerberick et al., 2007) and has been described as the molecular initiating event in the OECD adverse outcome pathway (OECD Publication No.168; ENV/JM/MONO(2012)10). Within this context measuring the amount of proteins with nucleophilic side chains such as cysteine or lysine residues after incubation with putative allergens serves as surrogate markers.

In the DPRA the reactivity of a test item (=test substance) towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides is evaluated. For this purpose the test substance is incubated with synthetic peptides for 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentration is determined thereafter by high performance liquid chromatography with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The peptide depletion of test-substance incubated samples is compared to the peptide depletion of the NC samples and expressed as relative peptide depletion.

Due to the complexity of the skin sensitization process a single in vitro assay is not sufficient to adequately assess this toxicological endpoint. Therefore, a combination of several methods addressing two major steps of the sensitization process: protein reactivity and activation of dendritic cells has been proposed in a strategy to assess the sensitizing potential (Bauch et al. 2012, Urbisch et al. 2015).

2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

2.3. TEST GUIDELINES

The study was conducted based on the following test guideline:

- OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

2.4. TIME SCHEDULE

Test dates:	Experimental starting date (1 st weighing of test substance for sample preparation)	22 Mar 2016
	Sample preparation (C- and K-peptide)	22 Mar 2016
	Experimental completion date (documentation of check of raw data)	13 May 2016

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. TEST ITEM

The test item (= test substance) was used with the given specifications of the producer (Sigma – Aldrich). No further analyses were conducted.

Name of test substance:	C12/C14-Mono-GE
Test-substance No.:	05/0691-2
Batch identification:	MKBH6600V
CAS No.:	68609-97-2
Purity /contents:	As purity/contents was not available a purity of 100% was assumed and used for calculation of the 100 mM test-substance preparation.
Identity:	Confirmed (see Certificate of Analysis in the Appendix)
Homogeneity:	The test substance was homogeneous by visual inspection.
Date of expiry:	05 Jan 2017

ADDITIONAL TEST-SUBSTANCE INFORMATION

Physical state / color:	Liquid / colorless, clear
Molecular weight:	300 g/mol
Log K _{ow} :	3.77 (taken from MSDS)
Proposed reaction mechanism for protein binding by OECD toolbox:	The OECD toolbox proposed the following reaction mechanism for protein binding for either the substance or its predicted metabolites (auto-oxidation, hydrolysis, and skin metabolism): nucleophilic substitution.

3.2. TEST SYSTEM

Synthetic peptides: Cysteine- (C-) containing peptide:
Ac-RFAACAA-COOH (MW=751.9 g/mol)
Lysine- (K-) containing peptide:
Ac-RFAAKAA-COOH (MW=776.2 g/mol)
The peptides are custom material (Supplier: GenScript, Picataway, NJ, USA and/or RS Synthesis, Louisville KY, USA) containing phenylalanine to aid in detection and either cysteine or lysine as the reactive center.

3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT

HPLC: Liquid chromatograph Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000 consisting of the following modules:

Pump: HPG-3400RS

Autosampler: WPS-3000TSL

Column oven: TCC-3000

UV-Detector: DAD-3000

Column: ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 μ m with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)

HPLC mobile phase A: H₂O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V

HPLC mobile phase B: ACN/H₂O/TFA 950/50/0.85 V/V/V

Incubator: Midi 40 Incubator (Thermo Scientific)

pH meter: Readability +/- 0.1 pH units.
For adjusting pH-values of buffers.

Reagents for preparing for pH 7.5 phosphate buffer (used for solving C-containing peptide):
the buffers:

Sodium phosphate, monobasic monohydrate, CAS no. 10049-21-5
(e.g. Sigma-Aldrich S9638)

Sodium phosphate, dibasic heptahydrate, CAS no. 7782-85-6
(e.g. Sigma-Aldrich S9390)

for pH 10.2 ammonium acetate buffer (used for solving K-containing peptide):

Ammonium acetate, CAS no. 631-61-8
(e.g. Sigma-Aldrich 32301)

Ammonium hydroxide, 28% – 30%, CAS no. 1336-21-6
(e.g. Sigma-Aldrich 320145)

3.4. CONTROLS

Negative control (NC): vehicle control = acetonitrile

Positive control (PC): Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA; CAS-no. 97-90-5), prepared as a 50 mM solution in acetonitrile.

Co-elution control: Sample prepared of the respective peptide buffer and the test substance but without peptide.

3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION

The test substance solution was prepared on a weight per volume basis within 4 hours of performing the assay (preparation of samples).

Test-substance preparation: The test substance was prepared as a 100 mM solution in acetonitrile. After short stirring the test substance was soluble in the vehicle.

Vehicle: acetonitrile

Reason for the vehicle: The test substance was soluble in acetonitrile.

3.6. ANALYSES

Because the test-substance preparation was incubated with the peptide shortly after preparation, no analysis of the test substance in the vehicle was performed.

3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE

The test substance was dissolved in a suitable vehicle. Three samples of the test substance were incubated with each peptide. Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides. The remaining non-depleted peptide concentration was determined thereafter by HPLC with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

In addition calibration samples of known peptide concentration, prepared from the respective peptide stock solution used for test-substance incubation, were measured in parallel with the same analytical method.

3.7.1. Test substance solubility

Prior to the assay the solubility of the test substance was tested. A suitable non-reactive, water-miscible solvent which dissolves the test substance completely (no visible precipitation or cloudiness of the test-substance preparation) should be used. The preferred solvent was acetonitrile. When not soluble in acetonitrile solutions in water, isopropanol, acetone, propanol, methanol or mixtures of these solvents were tried.

3.7.2. Preparation of peptide stock solutions

Peptide stock solutions in a concentration of 0.667 mM were prepared in pH 7.5 phosphate buffer (C-containing peptide) or pH 10.2 ammonium acetate buffer (K-containing peptide). The peptide stock solution was used for preparing the calibration samples and the test-substance and control samples.

3.7.2.1. Preparation of calibration samples

The following calibration samples were prepared from the peptide stock solutions in 20% acetonitrile:buffer (= dilution buffer) using serial dilution:

Table 1: Calibration samples of DPRA.

	Calib. 1	Calib. 2	Calib. 3	Calib. 4	Calib. 5	Calib. 6	Dilution buffer
mM peptide	0.534	0.267	0.134	0.067	0.033	0.017	0.000

The analysis of the calibration samples was started before analysis of the test-substance samples.

3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples

The samples were prepared in triplicates for each peptide.

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

The samples were prepared in suitable tubes, capped tightly and incubated at 25°C ± 2.5°C in the dark for 24 +/- 2 hours. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period. As the samples were visually turbid or displayed precipitates they were centrifuged prior to injection into the HPLC in order to remove any unsolved particles. The HPLC analysis of the batch of samples started about 24 hours after sample preparation and the analysis time itself did not exceed 30 hours.

3.7.3. Preparation of the vehicle controls

Several acetonitrile controls were prepared in triplicates in the same way as the test-substance samples described above but with acetonitrile instead of the test substance: One set (set A) was analyzed together with the calibration samples without incubation and serves as a performance control. Another three sets (two sets B and set C) were prepared and incubated with the samples. Sets B were placed at the very start and ending of the sample list and serve as stability control of the peptide over the analysis time. Set C was analyzed with the samples and serves for calculation of the peptide depletion of any chemical formulated in acetonitrile.

3.7.4. Preparation of the co-elution control

The co-elution control was prepared in the same way as the test-substance samples described above but without the peptide. Instead the respective peptide buffer was used. The samples were analyzed together with the calibration samples. As the samples were visually turbid or displayed precipitates they were centrifuged prior to injection into the HPLC in order to remove any unsolved particles.

3.7.5. Measurement of peptide concentrations

The analyses of the samples were performed via HPLC under the following conditions:

Table 2: HPLC conditions used for analysis of DPRA samples.

Column:	ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 µm with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)														
Eluent:	A: H2O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V B: ACN/H2O/TFA 950/50/0.85 V/V/V														
Flow:	0.50 mL/min														
Gradient:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>time [min]</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>8.1</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.1</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	time [min]	%B	0	5	8	20	8.1	90	10	90	10.1	5	16	5
time [min]	%B														
0	5														
8	20														
8.1	90														
10	90														
10.1	5														
16	5														
Wavelength:	220 nm and 258 nm														
Injection volume:	2 µL														
Software:	Dionex Chromeleon														

3.8. DATA EVALUATION

Table(s) and/or figure(s) of measured parameters presented in the report were produced using PC based tabular calculation software. The mean and individual data were not always rounded but the significant digits were produced by changing the display format. As a consequence, calculation of mean values using the individual data presented in the report will, in some instances, yield minor variations in value.

The integrated peak areas were transferred electronically into EXCEL data spreadsheets to carry out the necessary calculations.

Some test substances or reaction products may co-eluate with the peptides. In these cases where proper integration and calculation of peptide depletion was not possible, the result for the respective peptide is reported as interference.

When samples were additionally analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm, the area ratio 220 nm/ 258 nm may be calculated and serve as a measure of peak purity. The ratio of a pure peptide peak should be consistent over all samples (100% ± 10% of the mean of the vehicle controls). However, due to small peak areas calculation of the area ratio may not be possible for all samples.

3.8.1. Calculation of the peptide concentrations

For each peptide a calibration curve was generated from the measured peak areas of the calibration samples of known peptide concentration.

The peptide concentration of the samples was calculated with the respective calibration curve using linear regression (b = axis intercept; m = slope).

$$\text{Peptide concentration [mM]} = \frac{\text{peak area [mAU} \times s] - b}{m}$$

3.8.2. Calculation of the peptide depletion

The peptide depletion of a sample was calculated as follows:

$$\text{Peptide depletion of sample} = \left[1 - \frac{\text{peptide concentration of sample (mM)}}{\text{mean peptide concentration of NC (mM)}} \right] \times 100 \quad [\%]$$

The mean peptide depletion for each of the two peptides was calculated as the mean value of the three samples conducted for each peptide and test substance (C-containing and K-containing peptide depletion; example calculation for C-containing peptide):

$$\text{C - containing peptide depletion of a test substance} [\%] = \text{mean} [\text{C - containing peptide depletion of samples 1 - 3}] [\%]$$

When a negative value for C- or K-peptide depletion was obtained the value was considered zero for calculation of the mean peptide depletion.

The mean peptide depletion of a test substance was calculated as the mean value of C-containing peptide depletion and K-containing peptide depletion:

$$\text{Mean peptide depletion [\%]} = \frac{\text{C-containing peptide depletion [\%]} + \text{K-containing peptide depletion [\%]}}{2}$$

3.9. ACCEPTANCE CRITERIA

If any of the acceptance criteria mentioned below is not met, repetition of the test is considered. In the case of an unambiguous result the study director may decide that an experiment is valid despite a deviation of acceptance criteria. However, reasonable justification must then be given.

The standard calibration curve should have an $r^2 > 0.99$.

The negative control (vehicle control) samples of sets A and C should be 0.50 mM +/- 0.05 mM.

The CV of the nine vehicle controls B and C should be < 15%.

Since the mean peptide depletion for each peptide is determined from the mean of three single samples, the variability between these samples should be acceptably low (SD <14.9% for % cysteine depletion and <11.6% for % lysine depletion).

In addition, the positive control should cause depletion of both peptides comparable to historic data.

3.10. EVALUATION OF RESULTS

3.10.1. Peptide depletion

Chemical reactivity was determined by mean peptide depletion [%] and was rated as high, moderate, low, or minimal:

Table 3: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model.

Mean peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 42.47	high reactivity	positive
> 22.62 ≤ 42.47	moderate reactivity	positive
> 8.11 ≤ 22.62	low reactivity	positive
> 4.65 ≤ 8.11	no to low reactivity	borderline ¹
≤ 4.65	minimal or no reactivity	negative

In the case mean peptide depletion [%] cannot be determined due to invalid K-peptide depletion (e.g. insolubility of the K-peptide samples or interference in the samples of the K-peptide) but valid C-peptide depletion is available, evaluation is performed as follows:

Table 4: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 prediction model.

C peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 98.24	high reactivity	positive
> 23.09 ≤ 98.24	moderate reactivity	positive
> 17.28 ≤ 23.09	low reactivity	positive
> 10.50 ≤ 17.28	no to low reactivity	borderline ²
≤ 10.50	minimal or no reactivity	negative

¹ The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 6.38 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 6.38 ≤ 22.62 as “positive” (low reactivity).

² The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 13.89 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 13.89 ≤ 23.09 as “positive” (low reactivity).

3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure

For test substances that are not completely soluble by visual observation in the sample preparations containing the peptides immediately after preparation or after 24 hours, or when a gravimetric procedure is applied (with the exception of application of the undiluted test substance), the result may be under-predictive due to limited availability of the test substance. In this case mean peptide reactivity < 8.11% (Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model) or < 17.28% (Cysteine 1:10 prediction model) is interpreted as “inconclusive”. However, a mean peptide depletion > 8.11% or > 17.28% is considered as “positive”.

3.11. HISTORIC CONTROL DATA

Historic control values of negative and positive controls, gathered over an appropriate time period, are presented in section 4.6. These data demonstrate the reproducibility of results and robustness of the procedures. They are used to derive suitable acceptance criteria (see section 3.9) for the test system.

4. RESULTS

For sample chromatograms of the vehicle control, co-elution control and test-substance samples see Appendix.

4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE

4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
C: Calib. 1	0.534	721.2	17.1	42.2		
C: Calib. 2	0.267	357.9	8.7	41.1	Slope:	1343.7
C: Calib. 3	0.134	183.1	4.2	43.6	Axis intercept:	2.896
C: Calib. 4	0.067	101.1	n.a.	-	Correlation:	0.99987
C: Calib. 5	0.033	46.4	n.a.	-		
C: Calib. 6	0.017	23.2	n.a.	-		
C: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

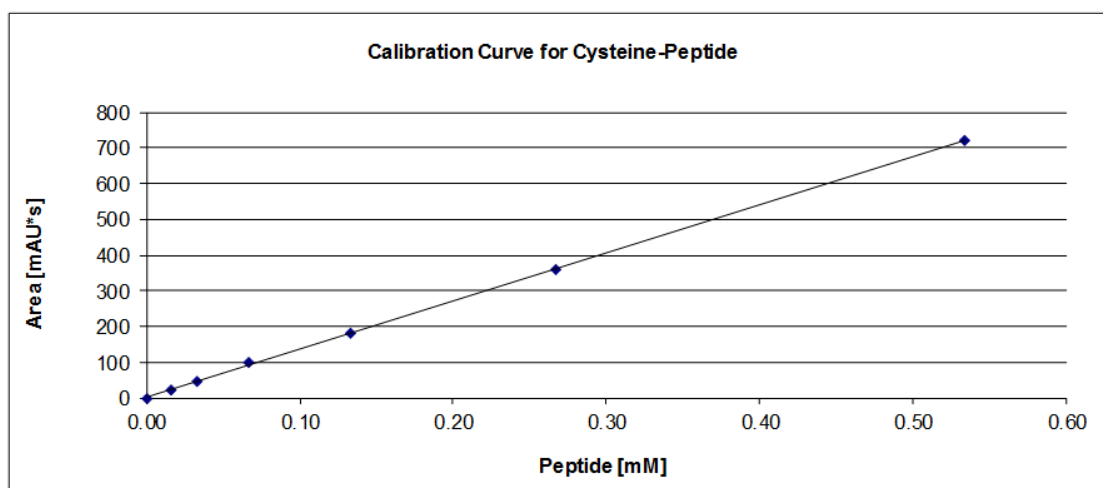


Figure 1: Calibration curve for Cysteine peptide

4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.491 mM with a SD of 0.009 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.475 mM with a SD of 0.002 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.478 mM with a SD of 0.002 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.4%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.1.3.

4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

Table 5: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	646.8	645.9	643.7	0.479	0.479	0.477	0.478	0.001
C12/C14-Mono-GE	615.7	614.9	612.6	0.456	0.455	0.454	0.455	0.001
PC: EGDMA in ACN	354.8	339.4	327.6	0.262	0.250	0.242	0.251	0.010

Reaction with cysteine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	-0.21	-0.07	0.28	0.00	0.25
C12/C14-Mono-GE	4.64	4.75	5.12	4.84	0.25
PC: EGDMA in ACN	45.23	47.63	49.47	47.45	2.12

Table 6: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	16.3	16.4	16.3	39.7	39.4	39.4
C12/C14-Mono-GE	15.7	15.5	15.4	39.3	39.7	39.8
PC: EGDMA in ACN	8.8	8.5	8.2	40.4	39.8	40.1

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 39.6. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 99.2% to 100.4% of the mean of the vehicle controls.

4.2. LYSINE-CONTAINING PEPTIDE

4.2.1. Lysine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
K: Calib. 1	0.534	567.7	14.0	40.6		
K: Calib. 2	0.267	289.5	7.2	40.2	Slope:	1059.4
K: Calib. 3	0.134	148.3	n.a.	-	Axis intercept:	4.264
K: Calib. 4	0.067	80.1	n.a.	-	Correlation:	0.99986
K: Calib. 5	0.033	37.7	n.a.	-		
K: Calib. 6	0.017	20.3	n.a.	-		
K: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

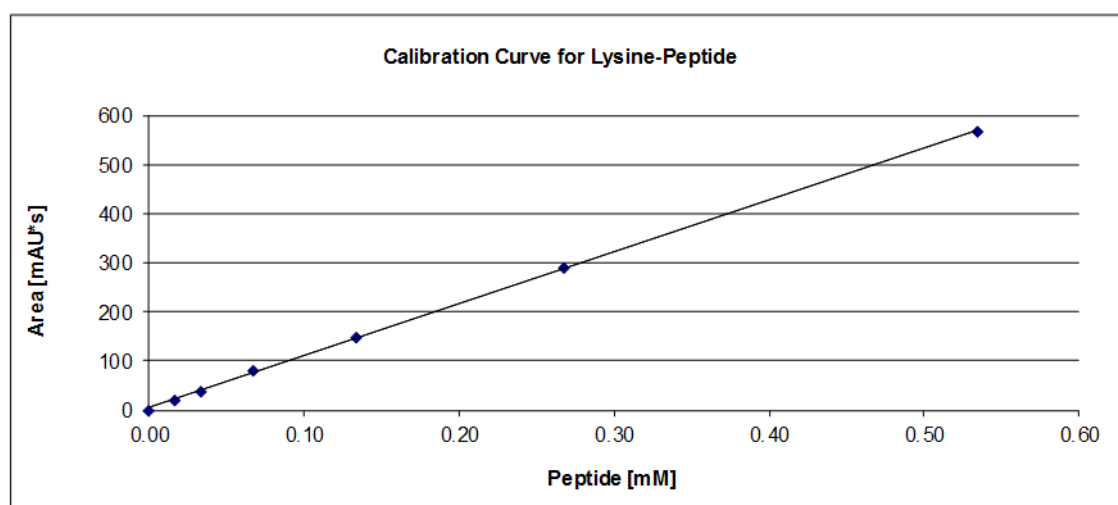


Figure 2: Calibration curve for Lysine peptide

4.2.2. Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.493 mM with a SD of 0.002 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.502 mM with a SD of 0.003 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.503 mM with a SD of 0.004 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.6%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.2.3.

4.2.3. Reaction with lysine-peptide

Table 7: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	536.4	535.2	530.5	0.502	0.501	0.497	0.500	0.003
C12/C14-Mono-GE	548.2	547.9	544.2	0.513	0.513	0.510	0.512	0.002
PC: EGDMA in ACN	476.5	479.6	477.0	0.446	0.449	0.446	0.447	0.002

Reaction with lysine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	-0.44	-0.22	0.66	0.00	0.58
C12/C14-Mono-GE	-2.68	-2.62	-1.92	-2.41	0.42
PC: EGDMA in ACN	10.86	10.27	10.77	10.63	0.32

Table 8: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	13.9	14.2	13.6	38.5	37.6	38.9
C12/C14-Mono-GE	14.3	14.1	14.3	38.4	38.8	38.1
PC: EGDMA in ACN	13.2	13.3	13.1	36.1	36.1	36.5

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 38.9. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 98.0% to 99.7% of the mean of the vehicle controls.

4.3. SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were emulsions at the time of preparation and after the 24-hour incubation time.

4.4. CO-ELUTION

No co-elution of the test substance and peptides occurred as demonstrated by the consistent values of the area ratios 220 nm/258 nm (for values see sections 4.1.3 and 4.2.3) and chromatograms of the co-elution control in the Appendix.

4.5. MEAN PEPTIDE DEPLETION

The mean peptide depletion as average of cysteine- and lysine-peptide depletions is calculated and summarized in the table below. Negative depletions were considered to be “zero” for calculation.

Table 9: Mean peptide depletions of Cysteine, Lysine and both peptides.

	Cysteine-Peptide		Lysine-Peptide		mean of both depletions [%]
	mean depletion [%]	SD [%]	mean depletion [%]	SD [%]	
C12/C14-Mono-GE	4.84	0.25	-2.41	0.42	2.42
PC: EGDMA in ACN	47.45	2.12	10.63	0.32	29.04

4.6. HISTORIC CONTROL DATA

The acceptance criteria mentioned in section 3.9 were met.

The positive control caused depletion of both peptides is comparable to historic data as can be seen in the following tables:

Table 10: Historic control data of negative control / vehicle control.

Acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	K-peptide concentration [mM]
Min	0.447	0.451
Max	0.542	0.541
Mean	0.484	0.503
SD	0.017	0.014
n	49	51

Table 11: Historic control data of positive control.

EGDMA, 50 mM in acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	C-peptide depletion [%]	K-peptide concentration [mM]	K-peptide depletion [%]
Min	0.058	43.32	0.373	7.99
Max	0.282	88.30	0.489	25.24
Mean	0.211	56.36	0.429	15.27
SD	0.040	8.09	0.024	3.23
n		31		31

5. CONCLUSION

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **C12/C14-Mono-GE, CAS No.: 68609-97-2, shows a minimal chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen. However, it should be noted that due to the limited solubility of the test substance the samples with both peptides were emulsions and that the result could therefore be under-predictive. Following OECD TG 442C a “negative” result should be considered “**inconclusive**” in this case (see section 3.10.2).

6. VALIDITY CRITERIA / REFERENCES

Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Eltze 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(3):489-504.

Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittenvin JP. (2007) Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicological Sciences* 97(2), 417-427.

OECD 2012: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins (2012) OECD ENVIRONMENT, HEALTH AND SAFETY PUBLICATIONS: No.168; ENV/JM/MONO(2012)10
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en) last accessed 05 Feb 2013.

OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle SN, Landsiedel R, Jaworska J, Kern P, 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. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71(2), 135-352.

7. LIST OF ABBREVIATIONS

The following list contains abbreviations and definitions generally used in reports for this study type. This report will not necessarily use all expressions listed below.

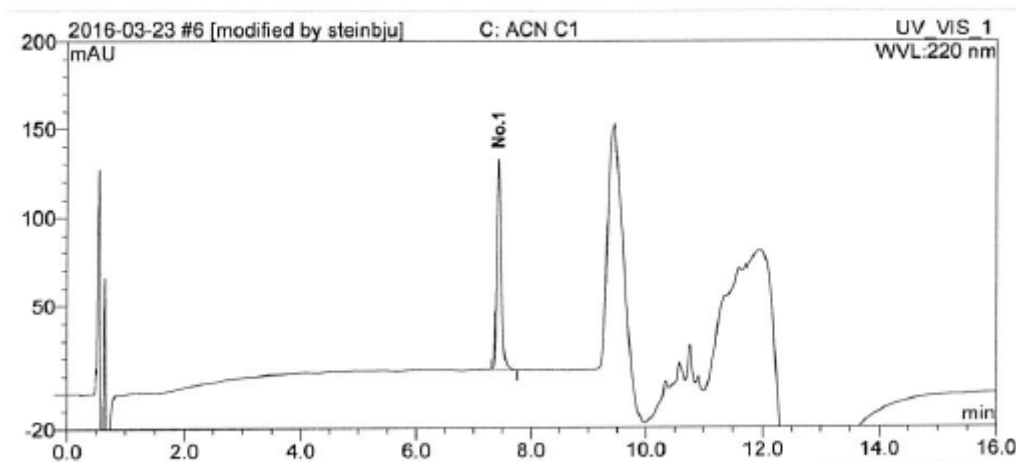
A	= alanine
AC	= acetone
Ac	= acetyl group
ACN	= acetonitrile
approx..	= approximately
C	= cysteine
ca.	= circa
Calib.	= calibration sample
cm	= centimeter
cm ²	= square centimeter
COOH	= carboxyl group
CV	= coefficient of variation
d	= day
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DTT	= dithiothreitol
EGDMA	= ethylene glycol dimethacrylate
F	= phenylalanine
G; g	= gram
h	= hour
IPA	= isopropyl alcohol (isopropanol)
K	= lysine
M	= mol / liter
mAU	= milli absorbance units
MeOH	= methanol
mg	= milligram
µg	= microgram
Min, min	= minute(s)
µL	= microliter
mL	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimol / liter
µm	= micrometer
MW	= Molecular weight

n.a.	= not assigned
NC	= negative control
No.; no.	= number
nm	= nanometer
p.a.	= per analysis
PC	= positive control
PrOH	= propanol
R	= arginine
SD	= standard deviation
SK	= co-elution control (Substanzkontrolle)
STD	= standard
TFA	= trifluoroacetic acid
UV	= ultraviolet
v/v	= volume / volume
Symbols:	
°C	= degree Celsius
~	= circa
=	= analogous
%	= per cent
∅	= diameter

APPENDIX

SAMPLE CHROMATOGRAMS

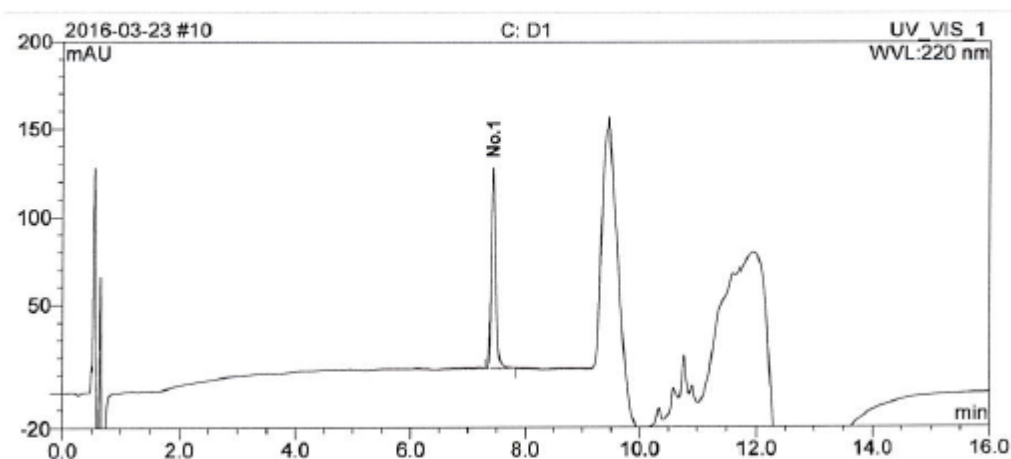
Sample Name:	C: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RA5	Recording Time:	23/03/16 11:47
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	7.4275	646.809	119.418		100.0

Figure 3: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the C-containing peptide

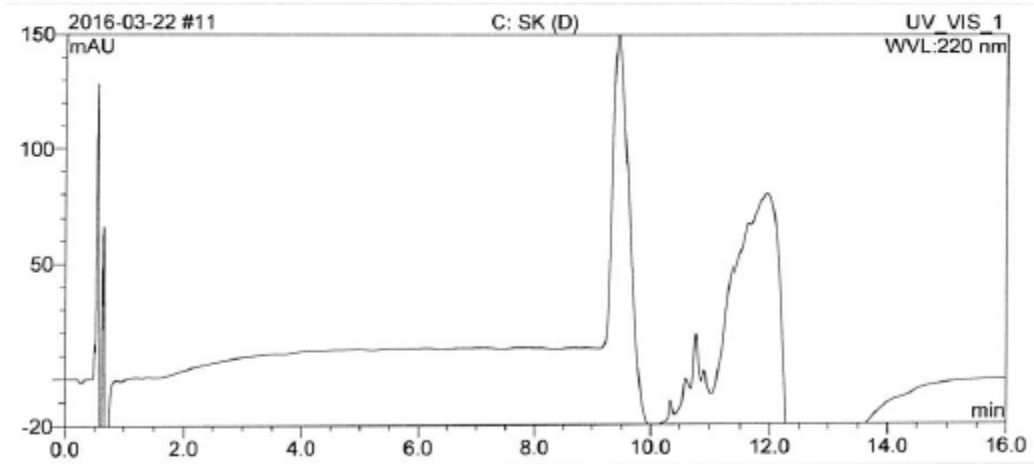
Sample Name:	C: D1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RB1	Recording Time:	23/03/16 12:54
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	7.4308	615.665	114.499		100.0

Figure 4: Test substance incubated with the C-containing peptide

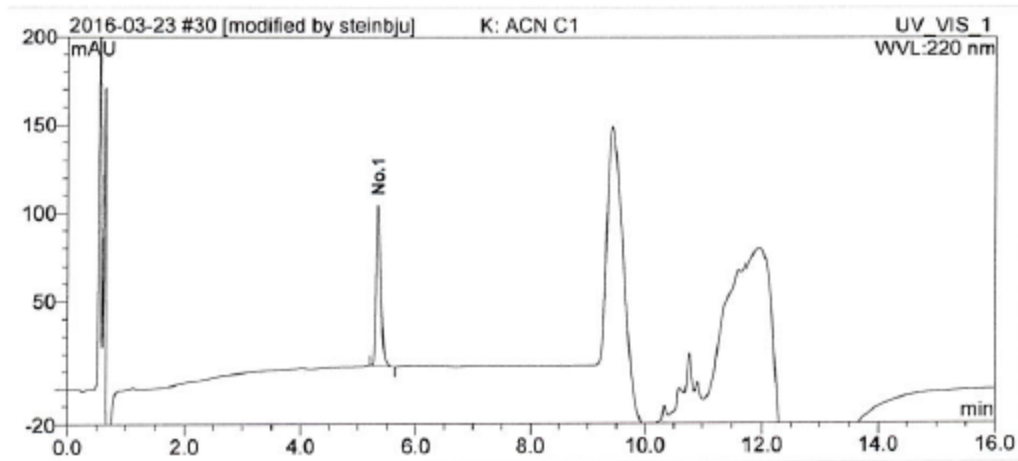
Sample Name:	C: SK (D)		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	22/03/16 14:06
Vial Number:	RB2	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
-----	--------------	------------	------------	----------------	------------

Figure 5: Co-elution control (sample in pH 7.5 phosphate buffer)

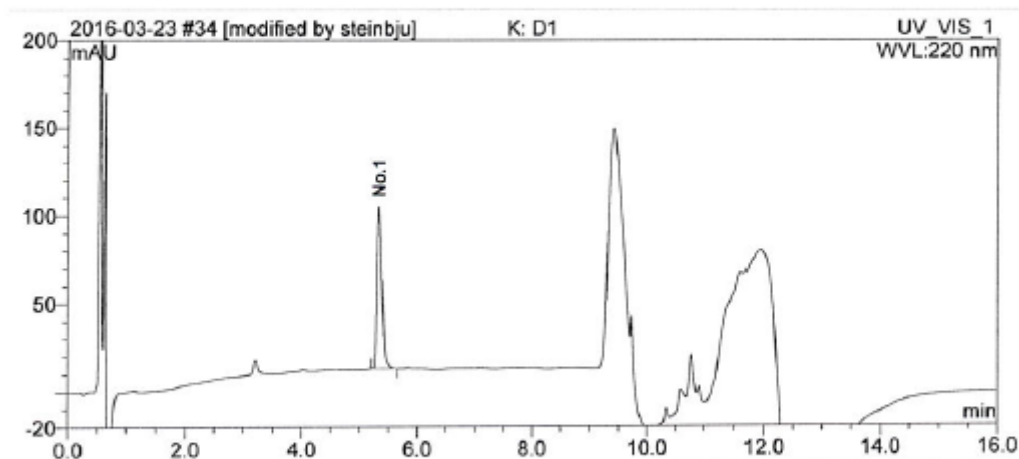
Sample Name:	K: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	23/03/16 18:32
Vial Number:	RD5	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.3317	536.365	90.916		100.0

Figure 6: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the K-containing peptide

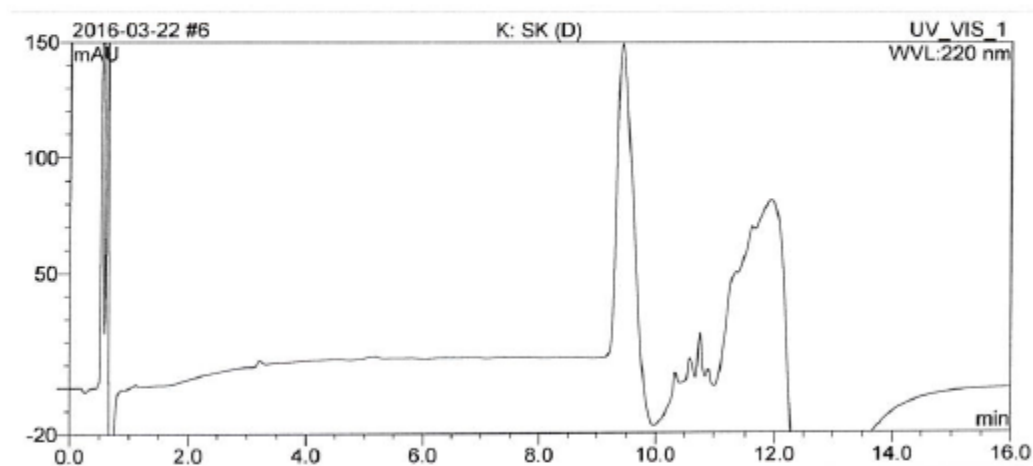
Sample Name:	K: D1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RE1	Recording Time:	23/03/16 19:39
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.3308	548.200	91.630		100.0

Figure 7: Test substance incubated with the K-containing peptide

Sample Name:	K: SK (D)		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RA5	Recording Time:	22/03/16 12:42
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.3308	548.200	91.630		100.0

Figure 8: Co-elution control (sample in pH 10.2 ammonium acetate buffer)

ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE

Certificate of Analysis

PSN 0510691-2

orig. 6.11.16 PR

SIGMA-ALDRICH

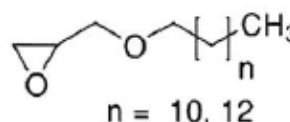
sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

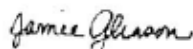
Certificate of Analysis

Product Name:
 Dodecyl and tetradecyl glycidyl ethers - technical grade

Product Number: 412848
 Lot Number: MKBH6600V
 Brand: ALDRICH
 CAS Number: 68609-97-2
 MDL Number: MFCD00192120
 Formula Weight: 300 g/mol
 Quality Release Date: 26 JUL 2011



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless to Yellow	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Miscellaneous Assay	≥ 0.32	0.33
Epoxy Value		
Viscosity	≤ 15 cps	7 cps
At 25°C		
Water (by Karl Fischer)	≤ 0.30 %	0.04 %



Jamie Gleason, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, Wisconsin US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

STUDY TITLE

Report

Phenyl-GE
CAS No.: 122-60-1In Vitro Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay
(DPRA Test)**TEST GUIDELINE(S)**

OECD 442C

AUTHOR(S)

B. Wareing B.Sc. (Study Director)

STUDY COMPLETION DATE

24 May 2016

TEST FACILITY

BASF SE

Experimental Toxicology and Ecology
67056 Ludwigshafen, Germany**TEST FACILITY PROJECT IDENTIFICATION**

Project No.: 64V0575/15A198

SPONSORForschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Klarastraße 63
79106 Freiburg, Germany

This document contains manufacturing and trade secrets of the Sponsor(s). It is the property of the Sponsor(s) and may be used only for that purpose for which it was intended by the Sponsor(s). Every other or additional use, exploitation, reproduction, publication or submission to other parties require the written permission of the Sponsor(s), with the exception of regulatory agencies acting within the limits of their administrative authority.

SIGNATURE PAGE

Study Director:

B. Wareing 24 May 2016
.....
B. Wareing B.Sc.

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

Head of Experimental Toxicology and Ecology:

Prof. Dr. rer. nat. B. v. Ravenzwaay

Test Facility Management:

Dr. rer. nat. R. Landsiedel

Study director:

B. Wareing B.Sc.

Applied Alternative Methods:

B. Wareing B. Sc.

CONTENTS

TITLE PAGE

SIGNATURE PAGE

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

CONTENTS

1. SUMMARY
2. INTRODUCTION
 - 2.1. OBJECTIVES
 - 2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS
 - 2.3. TEST GUIDELINES
 - 2.4. TIME SCHEDULE
3. MATERIALS AND METHODS
 - 3.1. TEST ITEM
 - 3.2. TEST SYSTEM
 - 3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT
 - 3.4. CONTROLS
 - 3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION
 - 3.6. ANALYSES
 - 3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE
 - 3.7.1. Test substance solubility
 - 3.7.2. Preparation of peptide stock solutions
 - 3.7.2.1. Preparation of calibration samples
 - 3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples
 - 3.7.3. Preparation of the vehicle controls
 - 3.7.4. Preparation of the co-elution control
 - 3.7.5. Measurement of peptide concentrations
 - 3.8. DATA EVALUATION
 - 3.8.1. Calculation of the peptide concentrations
 - 3.8.2. Calculation of the peptide depletion
 - 3.9. ACCEPTANCE CRITERIA
 - 3.10. EVALUATION OF RESULTS
 - 3.10.1. Peptide depletion
 - 3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure
 - 3.11. HISTORIC CONTROL DATA
4. RESULTS
 - 4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE
 - 4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve
 - 4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile
 - 4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

4.2.	LYSINE-CONTAINING PEPTIDE
4.2.1.	Lysine-peptide calibration curve
4.2.2.	Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile
4.2.3.	Reaction with lysine-peptide
4.3.	SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES
4.4.	CO-ELUTION
4.5.	MEAN PEPTIDE DEPLETION
4.6.	HISTORIC CONTROL DATA
5.	CONCLUSION
6.	VALIDITY CRITERIA / REFERENCES
7.	LIST OF ABBREVIATIONS
APPENDIX	
SAMPLE CHROMATOGRAMS	
ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE	
Certificate of Analysis	

1. SUMMARY

The reactivity of **Phenyl-GE** towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides was evaluated in the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). For this purpose the test substance was incubated with synthetic peptides for ca. 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The test substance was dissolved at a 100 mM concentration in acetonitrile. Three samples of the test substance were incubated with each peptide in ratios of 1:10 (for C-peptide) or 1:50 (for K-peptide). Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides.

Further, a co-elution control was assessed in order to detect possible interference of the test substance with the peptides. The samples consisted of the test substance, vehicle and the respective peptide buffer but without peptide. Moreover the samples were analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm and the area ratio 220 nm/ 258 nm was calculated as a measure of peak purity.

The following results were obtained in the DPRA:

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were solutions. Visual observation after the 24-hour incubation time did not reveal precipitates in any samples of the test substance with the peptides.

No co-elution of test substance and peptides was noticed.

The mean C-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 81.57%. The mean K-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 12.64%.

Thus, the mean peptide depletion was calculated to be 47.10%.

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **Phenyl-GE, CAS No.: 122-60, shows a high chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

2. INTRODUCTION

2.1. OBJECTIVES

Chemical reactivity has been shown to be well associated with allergenic potency (Gerberick et al., 2007) and has been described as the molecular initiating event in the OECD adverse outcome pathway (OECD Publication No.168; ENV/JM/MONO(2012)10). Within this context measuring the amount of proteins with nucleophilic side chains such as cysteine or lysine residues after incubation with putative allergens serves as surrogate markers.

In the DPRA the reactivity of a test item (=test substance) towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides is evaluated. For this purpose the test substance is incubated with synthetic peptides for 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentration is determined thereafter by high performance liquid chromatography with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The peptide depletion of test-substance incubated samples is compared to the peptide depletion of the NC samples and expressed as relative peptide depletion.

Due to the complexity of the skin sensitization process a single in vitro assay is not sufficient to adequately assess this toxicological endpoint. Therefore, a combination of several methods addressing two major steps of the sensitization process: protein reactivity and activation of dendritic cells has been proposed in a strategy to assess the sensitizing potential (Bauch et al. 2012, Urbisch et al. 2015).

2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

2.3. TEST GUIDELINES

The study was conducted based on the following test guideline:

- OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

2.4. TIME SCHEDULE

Test dates:	Experimental starting date (1 st weighing of test substance for sample preparation)	22 Mar 2016
	Sample preparation (C- and K-peptide)	22 Mar 2016
	Experimental completion date (documentation of check of raw data)	13 May 2016

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. TEST ITEM

The test item (= test substance) was used with the given specifications of the producer (Sigma – Aldrich). No further analyses were conducted.

Name of test substance:	Phenyl-GE
Test-substance No.:	15/0575-1
Batch identification:	BCBN6286V
CAS No.:	122-60-1
Purity:	99.8 % (see Certificate of Analysis in the Appendix; used for calculation of 100 mM preparation).
Identity:	Confirmed (see Certificate of Analysis in the Appendix)
Homogeneity:	The test substance was homogeneous by visual inspection.
Date of expiry:	05 Jan 2017

ADDITIONAL TEST-SUBSTANCE INFORMATION

Physical state / color:	Liquid / colorless, clear to pale yellow
Molecular weight:	150.17 g/mol
Log Kow:	1.61 (calculated)
Proposed reaction mechanism for protein binding by OECD toolbox:	The OECD toolbox proposed the following reaction mechanism for protein binding for either the substance or its predicted metabolites (auto-oxidation, hydrolysis, and skin metabolism): nucleophilic substitution

3.2. TEST SYSTEM

Synthetic peptides:	Cysteine- (C-) containing peptide: Ac-RFAACAA-COOH (MW=751.9 g/mol) Lysine- (K-) containing peptide: Ac-RFAAKAA-COOH (MW=776.2 g/mol) The peptides are custom material (Supplier: GenScript, Picataway, NJ, USA and/or RS Synthesis, Louisville KY, USA) containing phenylalanine to aid in detection and either cysteine or lysine as the reactive center.
---------------------	---

3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT

HPLC:	Liquid chromatograph Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000 consisting of the following modules: Pump: HPG-3400RS Autosampler: WPS-3000TSL Column oven: TCC-3000 UV-Detector: DAD-3000
Column:	ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 µm with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)
HPLC mobile phase A:	H ₂ O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V
HPLC mobile phase B:	ACN/H ₂ O/TFA 950/50/0.85 V/V/V
Incubator:	Midi 40 Incubator (Thermo Scientific)
pH meter:	Readability +/- 0.1 pH units. For adjusting pH-values of buffers.
Reagents for preparing the buffers:	for pH 7.5 phosphate buffer (used for solving C-containing peptide): Sodium phosphate, monobasic monohydrate, CAS no. 10049-21-5 (e.g. Sigma-Aldrich S9638) Sodium phosphate, dibasic heptahydrate, CAS no. 7782-85-6 (e.g. Sigma-Aldrich S9390) for pH 10.2 ammonium acetate buffer (used for solving K-containing peptide): Ammonium acetate, CAS no. 631-61-8 (e.g. Sigma-Aldrich 32301) Ammonium hydroxide, 28% – 30%, CAS no. 1336-21-6 (e.g. Sigma-Aldrich 320145)

3.4. CONTROLS

Negative control (NC):	vehicle control = acetonitrile
Positive control (PC):	Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA; CAS-no. 97-90-5), prepared as a 50 mM solution in acetonitrile.
Co-elution control:	Sample prepared of the respective peptide buffer and the test substance but without peptide.

3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION

The test substance solution was prepared on a weight per volume basis within 4 hours of performing the assay (preparation of samples).

Test-substance preparation: The test substance was prepared as a 100 mM solution in acetonitrile. After short stirring the test substance was soluble in the vehicle.

Vehicle: acetonitrile

Reason for the vehicle: The test substance was soluble in acetonitrile.

3.6. ANALYSES

Because the test-substance preparation was incubated with the peptide shortly after preparation, no analysis of the test substance in the vehicle was performed.

3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE

The test substance was dissolved in a suitable vehicle. Three samples of the test substance were incubated with each peptide. Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides. The remaining non-depleted peptide concentration was determined thereafter by HPLC with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

In addition calibration samples of known peptide concentration, prepared from the respective peptide stock solution used for test-substance incubation, were measured in parallel with the same analytical method.

3.7.1. Test substance solubility

Prior to the assay the solubility of the test substance was tested. A suitable non-reactive, water-miscible solvent which dissolves the test substance completely (no visible precipitation or cloudiness of the test-substance preparation) should be used. The preferred solvent was acetonitrile. When not soluble in acetonitrile solutions in water, isopropanol, acetone, propanol, methanol or mixtures of these solvents were tried.

3.7.2. Preparation of peptide stock solutions

Peptide stock solutions in a concentration of 0.667 mM were prepared in pH 7.5 phosphate buffer (C-containing peptide) or pH 10.2 ammonium acetate buffer (K-containing peptide). The peptide stock solution was used for preparing the calibration samples and the test-substance and control samples.

3.7.2.1. Preparation of calibration samples

The following calibration samples were prepared from the peptide stock solutions in 20% acetonitrile:buffer (= dilution buffer) using serial dilution:

Table 1: Calibration samples of DPRA.

	Calib. 1	Calib. 2	Calib. 3	Calib. 4	Calib. 5	Calib. 6	Dilution buffer
mM peptide	0.534	0.267	0.134	0.067	0.033	0.017	0.000

The analysis of the calibration samples was started before analysis of the test-substance samples.

3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples

The samples were prepared in triplicates for each peptide.

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

The samples were prepared in suitable tubes, capped tightly and incubated at 25°C ± 2.5°C in the dark for 24 +/- 2 hours. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period. The HPLC analysis of the batch of samples started about 24 hours after sample preparation and the analysis time itself did not exceed 30 hours.

3.7.3. Preparation of the vehicle controls

Several acetonitrile controls were prepared in triplicates in the same way as the test-substance samples described above but with acetonitrile instead of the test substance: One set (set A) was analyzed together with the calibration samples without incubation and serves as a performance control. Another three sets (two sets B and set C) were prepared and incubated with the samples. Sets B were placed at the very start and ending of the sample list and serve as stability control of the peptide over the analysis time. Set C was analyzed with the samples and serves for calculation of the peptide depletion of any chemical formulated in acetonitrile.

3.7.4. Preparation of the co-elution control

The co-elution control was prepared in the same way as the test-substance samples described above but without the peptide. Instead the respective peptide buffer was used. The samples were analyzed together with the calibration samples. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period.

3.7.5. Measurement of peptide concentrations

The analyses of the samples were performed via HPLC under the following conditions:

Table 2: HPLC conditions used for analysis of DPRA samples.

Column:	ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 µm with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)														
Eluent:	A: H ₂ O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V B: ACN/H ₂ O/TFA 950/50/0.85 V/V/V														
Flow:	0.50 mL/min														
Gradient:	<table><thead><tr><th>time [min]</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>5</td></tr><tr><td>8</td><td>20</td></tr><tr><td>8.1</td><td>90</td></tr><tr><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>10.1</td><td>5</td></tr><tr><td>16</td><td>5</td></tr></tbody></table>	time [min]	%B	0	5	8	20	8.1	90	10	90	10.1	5	16	5
time [min]	%B														
0	5														
8	20														
8.1	90														
10	90														
10.1	5														
16	5														
Wavelength:	220 nm and 258 nm														
Injection volume:	2 µL														
Software:	Dionex Chromeleon														

3.8. DATA EVALUATION

Table(s) and/or figure(s) of measured parameters presented in the report were produced using PC based tabular calculation software. The mean and individual data were not always rounded but the significant digits were produced by changing the display format. As a consequence, calculation of mean values using the individual data presented in the report will, in some instances, yield minor variations in value.

The integrated peak areas were transferred electronically into EXCEL data spreadsheets to carry out the necessary calculations.

Some test substances or reaction products may co-eluate with the peptides. In these cases where proper integration and calculation of peptide depletion was not possible, the result for the respective peptide is reported as interference.

When samples were additionally analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm, the area ratio 220 nm/ 258 nm may be calculated and serve as a measure of peak purity. The ratio of a pure peptide peak should be consistent over all samples (100% ± 10% of the mean of the vehicle controls). However, due to small peak areas calculation of the area ratio may not be possible for all samples.

3.8.1. Calculation of the peptide concentrations

For each peptide a calibration curve was generated from the measured peak areas of the calibration samples of known peptide concentration.

The peptide concentration of the samples was calculated with the respective calibration curve using linear regression (b = axis intercept; m = slope).

$$\text{Peptide concentration [mM]} = \frac{\text{peak area [mAU} \times \text{s]} - b}{m}$$

3.8.2. Calculation of the peptide depletion

The peptide depletion of a sample was calculated as follows:

$$\text{Peptide depletion of sample} = \left[1 - \frac{\text{peptide concentration of sample (mM)}}{\text{mean peptide concentration of NC (mM)}} \right] \times 100 \quad [\%]$$

The mean peptide depletion for each of the two peptides was calculated as the mean value of the three samples conducted for each peptide and test substance (C-containing and K-containing peptide depletion; example calculation for C-containing peptide):

$$\text{C - containing peptide depletion of a test substance} [\%] = \text{mean} [\text{C - containing peptide depletion of samples 1 - 3}] [\%]$$

When a negative value for C- or K-peptide depletion was obtained the value was considered zero for calculation of the mean peptide depletion.

The mean peptide depletion of a test substance was calculated as the mean value of C-containing peptide depletion and K-containing peptide depletion:

$$\text{Mean peptide depletion} [\%] = \frac{\text{C - containing peptide depletion} [\%] + \text{K - containing peptide depletion} [\%]}{2}$$

3.9. ACCEPTANCE CRITERIA

If any of the acceptance criteria mentioned below is not met, repetition of the test is considered. In the case of an unambiguous result the study director may decide that an experiment is valid despite a deviation of acceptance criteria. However, reasonable justification must then be given.

The standard calibration curve should have an $r^2 > 0.99$.

The negative control (vehicle control) samples of sets A and C should be 0.50 mM +/- 0.05 mM.

The CV of the nine vehicle controls B and C should be < 15%.

Since the mean peptide depletion for each peptide is determined from the mean of three single samples, the variability between these samples should be acceptably low (SD <14.9% for % cysteine depletion and <11.6% for % lysine depletion).

In addition, the positive control should cause depletion of both peptides comparable to historic data.

3.10. EVALUATION OF RESULTS

3.10.1. Peptide depletion

Chemical reactivity was determined by mean peptide depletion [%] and was rated as high, moderate, low, or minimal:

Table 3: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model.

Mean peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 42.47	high reactivity	positive
> 22.62 ≤ 42.47	moderate reactivity	positive
> 8.11 ≤ 22.62	low reactivity	positive
> 4.65 ≤ 8.11	no to low reactivity	borderline ¹
≤ 4.65	minimal or no reactivity	negative

¹ The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 6.38 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 6.38 ≤ 22.62 as “positive” (low reactivity).

In the case mean peptide depletion [%] cannot be determined due to invalid K-peptide depletion (e.g. insolubility of the K-peptide samples or interference in the samples of the K-peptide) but valid C-peptide depletion is available, evaluation is performed as follows:

Table 4: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 prediction model.

C peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 98.24	high reactivity	positive
> 23.09 ≤ 98.24	moderate reactivity	positive
> 17.28 ≤ 23.09	low reactivity	positive
> 10.50 ≤ 17.28	no to low reactivity	borderline ²
≤ 10.50	minimal or no reactivity	negative

3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure

For test substances that are not completely soluble by visual observation in the sample preparations containing the peptides immediately after preparation or after 24 hours, or when a gravimetric procedure is applied (with the exception of application of the undiluted test substance), the result may be under-predictive due to limited availability of the test substance. In this case mean peptide reactivity < 8.11% (Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model) or < 17.28% (Cysteine 1:10 prediction model) is interpreted as “inconclusive”. However, a mean peptide depletion > 8.11% or > 17.28% is considered as “positive”.

3.11. HISTORIC CONTROL DATA

Historic control values of negative and positive controls, gathered over an appropriate time period, are presented in section 4.6. These data demonstrate the reproducibility of results and robustness of the procedures. They are used to derive suitable acceptance criteria (see section 3.9) for the test system.

² The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 13.89 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 13.89 ≤ 23.09 as “positive” (low reactivity).

4. RESULTS

For sample chromatograms of the vehicle control, co-elution control and test-substance samples see Appendix.

4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE

4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
C: Calib. 1	0.534	721.2	17.1	42.2		
C: Calib. 2	0.267	357.9	8.7	41.1	Slope:	1343.7
C: Calib. 3	0.134	183.1	4.2	43.6	Axis intercept:	2.896
C: Calib. 4	0.067	101.1	n.a.	-	Correlation:	0.99987
C: Calib. 5	0.033	46.4	n.a.	-		
C: Calib. 6	0.017	23.2	n.a.	-		
C: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

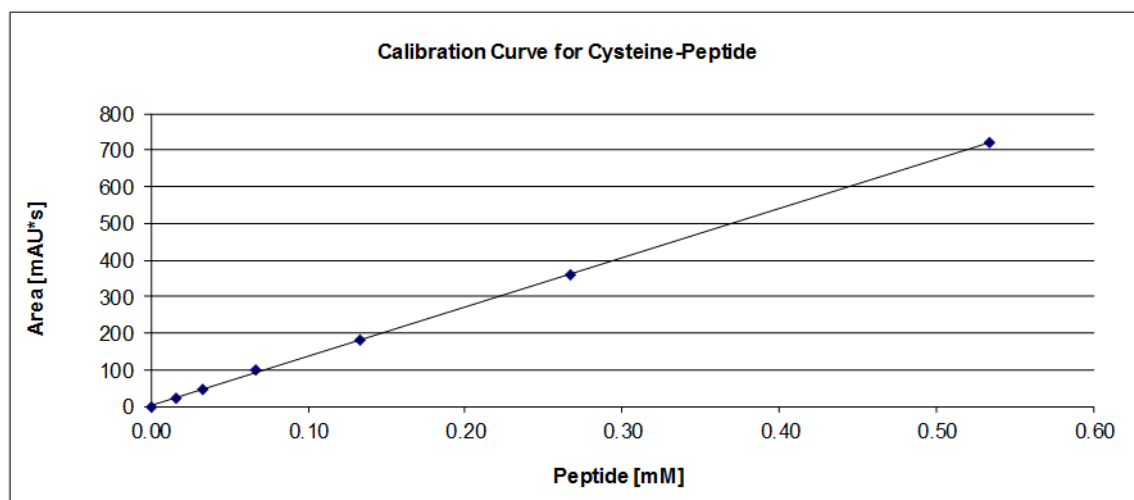


Figure 1: Calibration curve for Cysteine peptide

4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.491 mM with a SD of 0.009 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.475 mM with a SD of 0.002 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.478 mM with a SD of 0.002 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.4%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.1.3.

4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

Table 5: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	646.8	645.9	643.7	0.479	0.479	0.477	0.478	0.001
Phenyl-GE	135.4	119.2	109.4	0.099	0.087	0.079	0.088	0.010
PC: EGDMA in ACN	354.8	339.4	327.6	0.262	0.250	0.242	0.251	0.010

Reaction with cysteine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	-0.21	-0.07	0.28	0.00	0.25
Phenyl-GE	79.38	81.91	83.43	81.57	2.05
PC: EGDMA in ACN	45.23	47.63	49.47	47.45	2.12

Table 6: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	16.3	16.4	16.3	39.7	39.4	39.4
Phenyl-GE	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
PC: EGDMA in ACN	8.8	8.5	8.2	40.4	39.8	40.1

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 39.6.

For the test substance calculation of an area ratio 220 nm/ 258 nm was not possible due to small peak values.

4.2. LYSINE-CONTAINING PEPTIDE

4.2.1. Lysine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
K: Calib. 1	0.534	567.7	14.0	40.6		
K: Calib. 2	0.267	289.5	7.2	40.2	Slope:	1059.4
K: Calib. 3	0.134	148.3	n.a.	-	Axis intercept:	4.264
K: Calib. 4	0.067	80.1	n.a.	-	Correlation:	0.99986
K: Calib. 5	0.033	37.7	n.a.	-		
K: Calib. 6	0.017	20.3	n.a.	-		
K: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

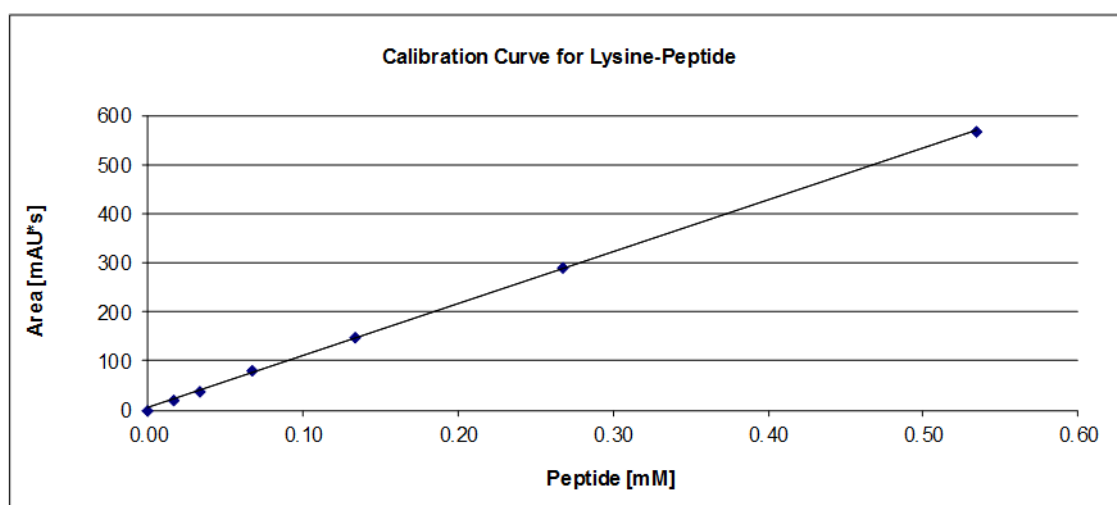


Figure 2: Calibration curve for Lysine peptide

4.2.2. Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.493 mM with a SD of 0.002 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.502 mM with a SD of 0.003 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.503 mM with a SD of 0.004 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.6%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.2.3.

4.2.3. Reaction with lysine-peptide

Table 7: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	536.4	535.2	530.5	0.502	0.501	0.497	0.500	0.003
Phenyl-GE	469.7	466.8	464.7	0.439	0.437	0.435	0.437	0.002
PC: EGDMA in ACN	476.5	479.6	477.0	0.446	0.449	0.446	0.447	0.002

Reaction with lysine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	-0.44	-0.22	0.66	0.00	0.58
Phenyl-GE	12.13	12.69	13.09	12.64	0.48
PC: EGDMA in ACN	10.86	10.27	10.77	10.63	0.32

Table 8: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	13.9	14.2	13.6	38.5	37.6	38.9
Phenyl-GE	12.6	12.6	12.6	37.4	37.2	37.0
PC: EGDMA in ACN	13.2	13.3	13.1	36.1	36.1	36.5

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 38.9. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 95.0% to 96.1% of the mean of the vehicle controls.

4.3. SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were solutions. Visual observation after the 24-hour incubation time did not reveal precipitates in any samples of the test substance with the peptides.

4.4. CO-ELUTION

No co-elution of the test substance and peptides occurred as demonstrated by the consistent values of the area ratios 220 nm/258 nm (available for lysine only due to low area values of the cysteine-peaks; for values see sections 4.1.3 and 4.2.3) and chromatograms of the co-elution control in the Appendix.

4.5. MEAN PEPTIDE DEPLETION

The mean peptide depletion as average of cysteine- and lysine-peptide depletions is calculated and summarized in the table below.

Table 9: Mean peptide depletions of Cysteine, Lysine and both peptides.

	Cysteine-Peptide		Lysine-Peptide		mean of both depletions [%]
	mean depletion [%]	SD [%]	mean depletion [%]	SD [%]	
Phenyl-GE	81.57	2.05	12.64	0.48	47.10
PC: EGDMA in ACN	47.45	2.12	10.63	0.32	29.04

4.6. HISTORIC CONTROL DATA

The acceptance criteria mentioned in section 3.9 were met.

The positive control caused depletion of both peptides is comparable to historic data as can be seen in the following table:

Table 10: Historic control data of negative control / vehicle control.

Acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	K-peptide concentration [mM]
Min	0.447	0.451
Max	0.542	0.541
Mean	0.484	0.503
SD	0.017	0.014
n	49	51

Table 11: Historic control data of positive control.

EGDMA, 50 mM in acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	C-peptide depletion [%]	K-peptide concentration [mM]	K-peptide depletion [%]
Min	0.058	43.32	0.373	7.99
Max	0.282	88.30	0.489	25.24
Mean	0.211	56.36	0.429	15.27
SD	0.040	8.09	0.024	3.23
n		31		31

5. CONCLUSION

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **Phenyl-GE, CAS No.: 122-60, shows a high chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

6. VALIDITY CRITERIA / REFERENCES

Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Eltze 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(3):489-504.

Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittenvin JP. (2007) Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicological Sciences* 97(2), 417-427.

OECD 2012: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins (2012) OECD ENVIRONMENT, HEALTH AND SAFETY PUBLICATIONS: No.168; ENV/JM/MONO(2012)10
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en) last accessed 05 Feb 2013.

OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle SN, Landsiedel R, Jaworska J, Kern P, 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. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71(2), 135-352.

7. LIST OF ABBREVIATIONS

The following list contains abbreviations and definitions generally used in reports for this study type. This report will not necessarily use all expressions listed below.

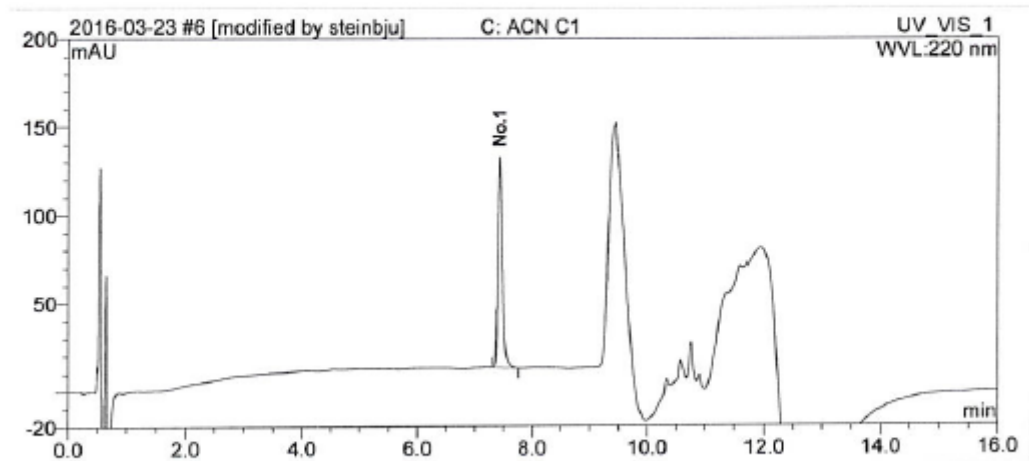
A	= alanine
AC	= acetone
Ac	= acetyl group
ACN	= acetonitrile
approx..	= approximately
C	= cysteine
ca.	= circa
Calib.	= calibration sample
cm	= centimeter
cm ²	= square centimeter
COOH	= carboxyl group
CV	= coefficient of variation
d	= day
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DTT	= dithiothreitol
EGDMA	= ethylene glycol dimethacrylate
F	= phenylalanine
G; g	= gram
h	= hour
IPA	= isopropyl alcohol (isopropanol)
K	= lysine
M	= mol / liter
mAU	= milli absorbance units
MeOH	= methanol
mg	= milligram
µg	= microgram
Min, min	= minute(s)
µL	= microliter
mL	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimol / liter
µm	= micrometer
MW	= Molecular weight

n.a.	= not assigned
NC	= negative control
No.; no.	= number
nm	= nanometer
p.a.	= per analysis
PC	= positive control
PrOH	= propanol
R	= arginine
SD	= standard deviation
SK	= co-elution control (Substanzkontrolle)
STD	= standard
TFA	= trifluoroacetic acid
UV	= ultraviolet
v/v	= volume / volume
Symbols:	
°C	= degree Celsius
~	= circa
=	= analogous
%	= per cent
∅	= diameter

APPENDIX

SAMPLE CHROMATOGRAMS

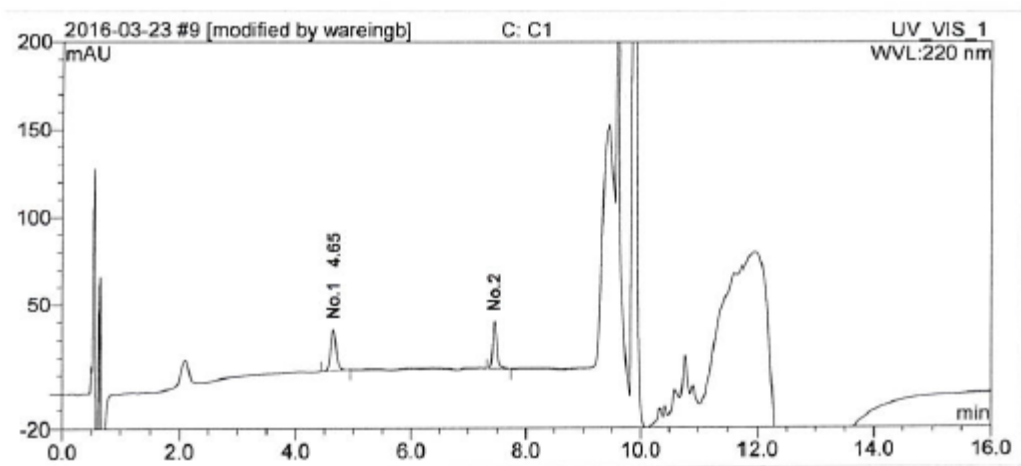
Sample Name:	C: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	23/03/16 11:47
Vial Number:	RA5	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	7.4275	646.809	119.418		100.0

Figure 3: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the C-containing peptide

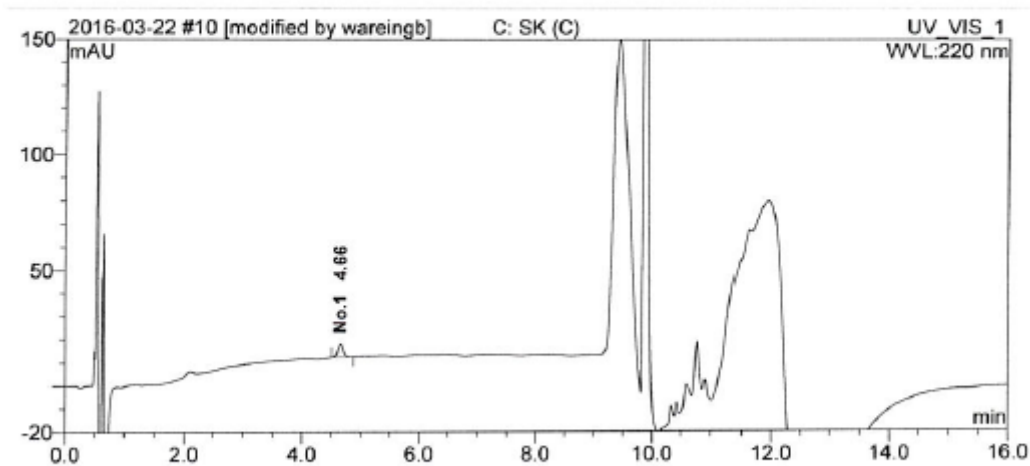
Sample Name:	C: C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	23/03/16 12:37
Vial Number:	RA8	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	4.6533	146.950	23.293		52.0
2	7.4533	135.419	26.654	282.369	48.0

Figure 4: Test substance incubated with the C-containing peptide

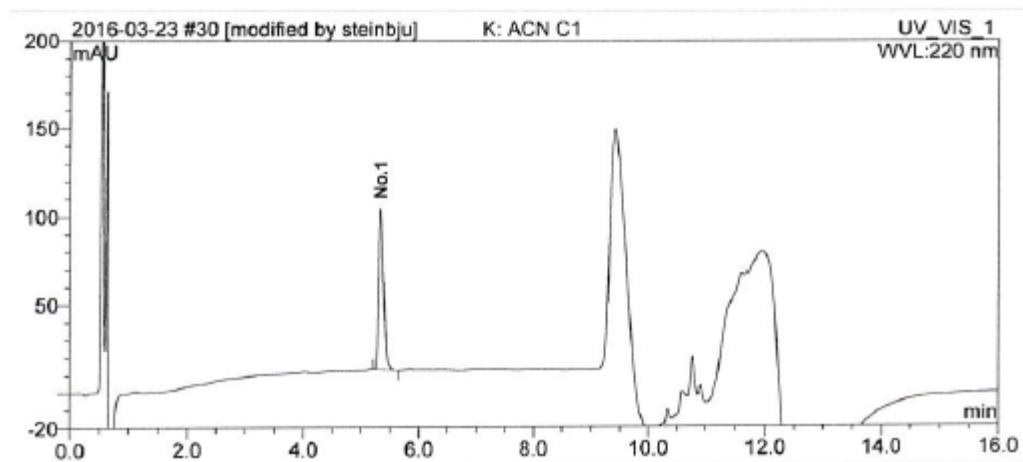
Sample Name:	C: SK (C)		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RB1	Recording Time:	22/03/16 13:49
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	4.6583	35.576	5.766		100.0

Figure 5: Co-elution control (sample in pH 7.5 phosphate buffer)

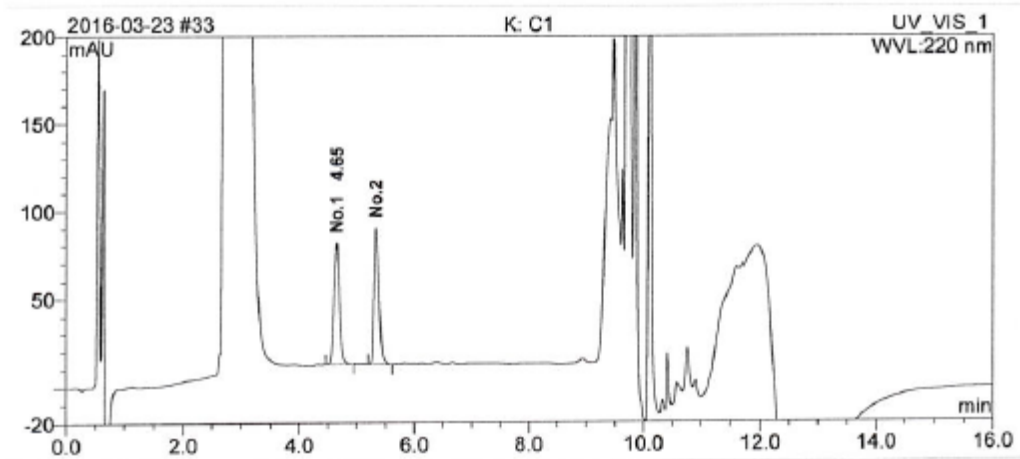
Sample Name:	K: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RD5	Recording Time:	23/03/16 18:32
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.3317	536.365	90.916		100.0

Figure 6: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the K-containing peptide

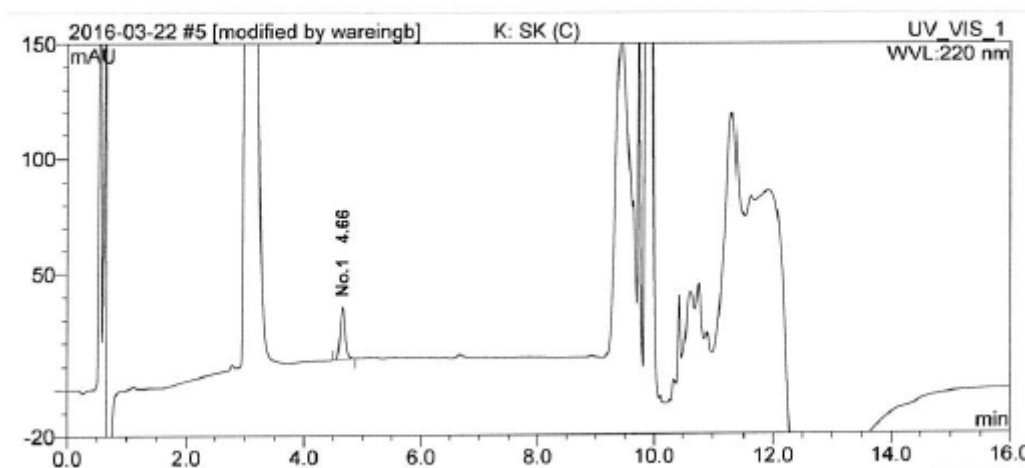
Sample Name:	K: C1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RD8	Recording Time:	23/03/16 19:23
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret. Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel. Area %
1	4.6525	427.124	68.669		47.6
2	5.3267	469.737	77.183	896.861	52.4

Figure 7: Test substance incubated with the K-containing peptide

Sample Name:	K: SK (C)		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RA4	Recording Time:	22/03/16 12:25
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret. Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel. Area %
1	4.6575	135.920	22.512		100.0

Figure 8: Co-elution control (sample in pH 10.2 ammonium acetate buffer)

ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@slal.com Outside USA: eurtechserv@slal.com**Certificate of Analysis**

Product Name: 1,2-EPOXY-3-PHENOXYPROPANE
99 %
Product Number: 248487
Batch Number: BCBN6286V
Brand: Aldrich
CAS Number: 122-60-1
Formula: C₉H₁₀O₂
Formula Weight: 150.17
Quality Release Date: 13 AUG 2014

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS TO PALE YELLOW	COLORLESS
APPEARANCE (FORM)	LIQUID	LIQUID
PURITY (GC AREA %)	98.5 % (MINIMUM)	98.8 %
REFRACTIVE INDEX N20/D	1.530 ± 0.002	1.531
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

STUDY TITLE

Report

o-Kresylglycidylether**CAS No.: 2210-79-9**In Vitro Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay
(DPRA Test)**TEST GUIDELINE(S)**

OECD 442C

AUTHOR(S)

B. Wareing B.Sc. (Study Director)

STUDY COMPLETION DATE

24 May 2016

TEST FACILITY

BASF SE

Experimental Toxicology and Ecology
67056 Ludwigshafen, Germany**TEST FACILITY PROJECT IDENTIFICATION**

Project No.: 64V0576/15A199

SPONSORForschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Klarastraße 63
79106 Freiburg, Germany

This document contains manufacturing and trade secrets of the Sponsor(s). It is the property of the Sponsor(s) and may be used only for that purpose for which it was intended by the Sponsor(s). Every other or additional use, exploitation, reproduction, publication or submission to other parties require the written permission of the Sponsor(s), with the exception of regulatory agencies acting within the limits of their administrative authority.

SIGNATURE PAGE

Study Director:

B. Wareing 24 May 2016
B. Wareing B.Sc.

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

Head of Experimental Toxicology and Ecology:

Prof. Dr. rer. nat. B. v. Ravenzwaay

Test Facility Management:

Dr. rer. nat. R. Landsiedel

Study director:

B. Wareing B.Sc.

Applied Alternative Methods:

B. Wareing B.Sc.

CONTENTS

TITLE PAGE

SIGNATURE PAGE

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

CONTENTS

1. SUMMARY
2. INTRODUCTION
 - 2.1. OBJECTIVES
 - 2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS
 - 2.3. TEST GUIDELINES
 - 2.4. TIME SCHEDULE
3. MATERIALS AND METHODS
 - 3.1. TEST ITEM
 - 3.2. TEST SYSTEM
 - 3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT
 - 3.4. CONTROLS
 - 3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION
 - 3.6. ANALYSES
 - 3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE
 - 3.7.1. Test substance solubility
 - 3.7.2. Preparation of peptide stock solutions
 - 3.7.2.1. Preparation of calibration samples
 - 3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples
 - 3.7.3. Preparation of the vehicle controls
 - 3.7.4. Preparation of the co-elution control
 - 3.7.5. Measurement of peptide concentrations
 - 3.8. DATA EVALUATION
 - 3.8.1. Calculation of the peptide concentrations
 - 3.8.2. Calculation of the peptide depletion
 - 3.9. ACCEPTANCE CRITERIA
 - 3.10. EVALUATION OF RESULTS
 - 3.10.1. Peptide depletion
 - 3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure
 - 3.11. HISTORIC CONTROL DATA
4. RESULTS
 - 4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE
 - 4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve
 - 4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile
 - 4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

4.2.	LYSINE-CONTAINING PEPTIDE
4.2.1.	Lysine-peptide calibration curve
4.2.2.	Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile
4.2.3.	Reaction with lysine-peptide
4.3.	SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES
4.4.	CO-ELUTION
4.5.	MEAN PEPTIDE DEPLETION
4.6.	HISTORIC CONTROL DATA
5.	CONCLUSION
6.	VALIDITY CRITERIA / REFERENCES
7.	LIST OF ABBREVIATIONS
APPENDIX	
SAMPLE CHROMATOGRAMS	
ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE	
Certificate of Analysis	

1. SUMMARY

The reactivity of **o-Kresylglycidylether, CAS No.: 2210-79-9**, towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides was evaluated in the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). For this purpose the test substance was incubated with synthetic peptides for ca. 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The test substance was dissolved at a 100 mM concentration in acetonitrile. Three samples of the test substance were incubated with each peptide in ratios of 1:10 (for C-peptide) or 1:50 (for K-peptide). Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides.

Further, a co-elution control was assessed in order to detect possible interference of the test substance with the peptides. The samples consisted of the test substance, vehicle and the respective peptide buffer but without peptide. Moreover the samples were analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm and the area ratio 220 nm/ 258 nm was calculated as a measure of peak purity.

The following results were obtained in the DPRA:

The test substance was soluble in acetonitrile. The samples of the test substance with the C-peptide were solutions at the time of preparation and after 24 hours. The samples of the test substance with the K-peptide were emulsions at the time of preparation and after 24 hours. Thus the samples of the K-peptide were centrifuged prior to HPLC analysis.

No co-elution of test substance and peptides was noticed.

The mean C-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 81.34%. The mean K-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 100.00%.

As the K-peptide depletion was 100.00% no under-prediction of the reaction can be present although the samples of the K-peptide were no solutions. Hence, mean peptide depletion was calculated and evaluation performed according to the cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model.

The mean peptide depletion was calculated to be 90.67%.

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **o-Kresylglycidylether, CAS No.: 2210-79-9, shows a high chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

2. INTRODUCTION

2.1. OBJECTIVES

Chemical reactivity has been shown to be well associated with allergenic potency (Gerberick et al., 2007) and has been described as the molecular initiating event in the OECD adverse outcome pathway (OECD Publication No.168; ENV/JM/MONO(2012)10). Within this context measuring the amount of proteins with nucleophilic side chains such as cysteine or lysine residues after incubation with putative allergens serves as surrogate markers.

In the DPRA the reactivity of a test item (=test substance) towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides is evaluated. For this purpose the test substance is incubated with synthetic peptides for 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentration is determined thereafter by high performance liquid chromatography with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The peptide depletion of test-substance incubated samples is compared to the peptide depletion of the NC samples and expressed as relative peptide depletion.

Due to the complexity of the skin sensitization process a single in vitro assay is not sufficient to adequately assess this toxicological endpoint. Therefore, a combination of several methods addressing two major steps of the sensitization process: protein reactivity and activation of dendritic cells has been proposed in a strategy to assess the sensitizing potential (Bauch et al. 2012, Urbisch et al. 2015).

2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

2.3. TEST GUIDELINES

The study was conducted based on the following test guideline:

- OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

2.4. TIME SCHEDULE

Test dates:	Experimental starting date (1 st weighing of test substance for sample preparation)	22 Mar 2016
	Sample preparation (C- and K-peptide)	22 Mar 2016
	Experimental completion date (documentation of check of raw data)	13 May 2016

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. TEST ITEM

The test item (= test substance) was used with the given specifications of the producer (Sigma – Aldrich). No further analyses were conducted.

Name of test substance:	o-Kresylglycidylether
Test-substance No.:	15/0576-1
Batch identification:	MKBP7140V
CAS No.:	2210-79-9
Purity:	91.3 % (see Certificate of Analysis in the Appendix; used for calculation of 100 mM preparation).
Identity:	Confirmed (see Certificate of Analysis in the Appendix)
Homogeneity:	The test substance was homogeneous by visual inspection.
Date of expiry:	06 Jan 2017

ADDITIONAL TEST-SUBSTANCE INFORMATION

Physical state / color:	Liquid / colorless, clear
Molecular weight:	164.2 g/mol
Log Kow:	2.16 (calculated)
Proposed reaction mechanism for protein binding by OECD toolbox:	The OECD toolbox proposed the following reaction mechanism for protein binding for either the substance or its predicted metabolites (auto-oxidation, hydrolysis, and skin metabolism): Michael addition and nucleophilic substitution.

3.2. TEST SYSTEM

Synthetic peptides: Cysteine- (C-) containing peptide:
Ac-RFAACAA-COOH (MW=751.9 g/mol)
Lysine- (K-) containing peptide:
Ac-RFAAKAA-COOH (MW=776.2 g/mol)
The peptides are custom material (Supplier: GenScript, Picataway, NJ, USA and/or RS Synthesis, Louisville KY, USA) containing phenylalanine to aid in detection and either cysteine or lysine as the reactive center.

3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT

HPLC: Liquid chromatograph Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000 consisting of the following modules:

Pump: HPG-3400RS

Autosampler: WPS-3000TSL

Column oven: TCC-3000

UV-Detector: DAD-3000

Column: ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 μ m with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)

HPLC mobile phase A: H₂O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V

HPLC mobile phase B: ACN/H₂O/TFA 950/50/0.85 V/V/V

Incubator: Midi 40 Incubator (Thermo Scientific)

pH meter: Readability +/- 0.1 pH units.
For adjusting pH-values of buffers.

Reagents for preparing for pH 7.5 phosphate buffer (used for solving C-containing peptide):
the buffers:

Sodium phosphate, monobasic monohydrate, CAS no. 10049-21-5
(e.g. Sigma-Aldrich S9638)

Sodium phosphate, dibasic heptahydrate, CAS no. 7782-85-6
(e.g. Sigma-Aldrich S9390)

for pH 10.2 ammonium acetate buffer (used for solving K-containing peptide):

Ammonium acetate, CAS no. 631-61-8
(e.g. Sigma-Aldrich 32301)

Ammonium hydroxide, 28% – 30%, CAS no. 1336-21-6
(e.g. Sigma-Aldrich 320145)

3.4. CONTROLS

Negative control (NC): vehicle control = acetonitrile

Positive control (PC): Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA; CAS-no. 97-90-5), prepared as a 50 mM solution in acetonitrile.

Co-elution control: Sample prepared of the respective peptide buffer and the test substance but without peptide.

3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION

The test substance solution was prepared on a weight per volume basis within 4 hours of performing the assay (preparation of samples).

Test-substance preparation: The test substance was prepared as a 100 mM solution in acetonitrile. After short stirring the test substance was soluble in the vehicle.

Vehicle: acetonitrile

Reason for the vehicle: The test substance was soluble in acetonitrile.

3.6. ANALYSES

Because the test-substance preparation was incubated with the peptide shortly after preparation, no analysis of the test substance in the vehicle was performed.

3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE

The test substance was dissolved in a suitable vehicle. Three samples of the test substance were incubated with each peptide. Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides. The remaining non-depleted peptide concentration was determined thereafter by HPLC with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

In addition calibration samples of known peptide concentration, prepared from the respective peptide stock solution used for test-substance incubation, were measured in parallel with the same analytical method.

3.7.1. Test substance solubility

Prior to the assay the solubility of the test substance was tested. A suitable non-reactive, water-miscible solvent which dissolves the test substance completely (no visible precipitation or cloudiness of the test-substance preparation) should be used. The preferred solvent was acetonitrile. When not soluble in acetonitrile solutions in water, isopropanol, acetone, propanol, methanol or mixtures of these solvents were tried.

3.7.2. Preparation of peptide stock solutions

Peptide stock solutions in a concentration of 0.667 mM were prepared in pH 7.5 phosphate buffer (C-containing peptide) or pH 10.2 ammonium acetate buffer (K-containing peptide). The peptide stock solution was used for preparing the calibration samples and the test-substance and control samples.

3.7.2.1. Preparation of calibration samples

The following calibration samples were prepared from the peptide stock solutions in 20% acetonitrile:buffer (= dilution buffer) using serial dilution:

Table 1: Calibration samples of DPRA.

	Calib. 1	Calib. 2	Calib. 3	Calib. 4	Calib. 5	Calib. 6	Dilution buffer
mM peptide	0.534	0.267	0.134	0.067	0.033	0.017	0.000

The analysis of the calibration samples was started before analysis of the test-substance samples.

3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples

The samples were prepared in triplicates for each peptide.

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

The samples were prepared in suitable tubes, capped tightly and incubated at 25°C ± 2.5°C in the dark for 24 +/- 2 hours. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period. Samples that were visually turbid or displayed precipitates were centrifuged prior to injection into the HPLC in order to remove any unsolved particles. The HPLC analysis of the batch of samples started about 24 hours after sample preparation and the analysis time itself did not exceed 30 hours.

3.7.3. Preparation of the vehicle controls

Several acetonitrile controls were prepared in triplicates in the same way as the test-substance samples described above but with acetonitrile instead of the test substance: One set (set A) was analyzed together with the calibration samples without incubation and serves as a performance control. Another three sets (two sets B and set C) were prepared and incubated with the samples. Sets B were placed at the very start and ending of the sample list and serve as stability control of the peptide over the analysis time. Set C was analyzed with the samples and serves for calculation of the peptide depletion of any chemical formulated in acetonitrile.

3.7.4. Preparation of the co-elution control

The co-elution control was prepared in the same way as the test-substance samples described above but without the peptide. Instead the respective peptide buffer was used. The samples were analyzed together with the calibration samples. Samples that were visually turbid or displayed precipitates were centrifuged prior to injection into the HPLC in order to remove any unsolved particles.

3.7.5. Measurement of peptide concentrations

The analyses of the samples were performed via HPLC under the following conditions:

Table 2: HPLC conditions used for analysis of DPRA samples.

Column:	ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 µm with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)														
Eluent:	A: H2O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V B: ACN/H2O/TFA 950/50/0.85 V/V/V														
Flow:	0.50 mL/min														
Gradient:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>time [min]</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>8.1</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.1</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	time [min]	%B	0	5	8	20	8.1	90	10	90	10.1	5	16	5
time [min]	%B														
0	5														
8	20														
8.1	90														
10	90														
10.1	5														
16	5														
Wavelength:	220 nm and 258 nm														
Injection volume:	2 µL														
Software:	Dionex Chromeleon														

3.8. DATA EVALUATION

Table(s) and/or figure(s) of measured parameters presented in the report were produced using PC based tabular calculation software. The mean and individual data were not always rounded but the significant digits were produced by changing the display format. As a consequence, calculation of mean values using the individual data presented in the report will, in some instances, yield minor variations in value.

The integrated peak areas were transferred electronically into EXCEL data spreadsheets to carry out the necessary calculations.

Some test substances or reaction products may co-eluate with the peptides. In these cases where proper integration and calculation of peptide depletion was not possible, the result for the respective peptide is reported as interference.

When samples were additionally analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm, the area ratio 220 nm/ 258 nm may be calculated and serve as a measure of peak purity. The ratio of a pure peptide peak should be consistent over all samples (100% ± 10% of the mean of the vehicle controls). However, due to small peak areas calculation of the area ratio may not be possible for all samples.

3.8.1. Calculation of the peptide concentrations

For each peptide a calibration curve was generated from the measured peak areas of the calibration samples of known peptide concentration.

The peptide concentration of the samples was calculated with the respective calibration curve using linear regression (b = axis intercept; m = slope).

$$\text{Peptide concentration [mM]} = \frac{\text{peak area [mAU} \times \text{s]} - b}{m}$$

3.8.2. Calculation of the peptide depletion

The peptide depletion of a sample was calculated as follows:

$$\text{Peptide depletion of sample} = \left[1 - \frac{\text{peptide concentration of sample (mM)}}{\text{mean peptide concentration of NC (mM)}} \right] \times 100 \quad [\%]$$

The mean peptide depletion for each of the two peptides was calculated as the mean value of the three samples conducted for each peptide and test substance (C-containing and K-containing peptide depletion; example calculation for C-containing peptide):

$$\text{C - containing peptide depletion of a test substance} [\%] = \text{mean} [\text{C - containing peptide depletion of samples 1 - 3}] [\%]$$

When a negative value for C- or K-peptide depletion was obtained the value was considered zero for calculation of the mean peptide depletion.

The mean peptide depletion of a test substance was calculated as the mean value of C-containing peptide depletion and K-containing peptide depletion:

$$\text{Mean peptide depletion [\%]} = \frac{\text{C - containing peptide depletion [\%]} + \text{K - containing peptide depletion [\%]}}{2}$$

3.9. ACCEPTANCE CRITERIA

If any of the acceptance criteria mentioned below is not met, repetition of the test is considered. In the case of an unambiguous result the study director may decide that an experiment is valid despite a deviation of acceptance criteria. However, reasonable justification must then be given.

The standard calibration curve should have an $r^2 > 0.99$.

The negative control (vehicle control) samples of sets A and C should be 0.50 mM +/- 0.05 mM.

The CV of the nine vehicle controls B and C should be < 15%.

Since the mean peptide depletion for each peptide is determined from the mean of three single samples, the variability between these samples should be acceptably low (SD <14.9% for % cysteine depletion and <11.6% for % lysine depletion).

In addition, the positive control should cause depletion of both peptides comparable to historic data.

3.10. EVALUATION OF RESULTS

3.10.1. Peptide depletion

Chemical reactivity was determined by mean peptide depletion [%] and was rated as high, moderate, low, or minimal:

Table 3: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model.

Mean peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 42.47	high reactivity	positive
> 22.62 ≤ 42.47	moderate reactivity	positive
> 8.11 ≤ 22.62	low reactivity	positive
> 4.65 ≤ 8.11	no to low reactivity	borderline ¹
≤ 4.65	minimal or no reactivity	negative

In the case mean peptide depletion [%] cannot be determined due to invalid K-peptide depletion (e.g. insolubility of the K-peptide samples or interference in the samples of the K-peptide) but valid C-peptide depletion is available, evaluation is performed as follows:

Table 4: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 prediction model.

C peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 98.24	high reactivity	positive
> 23.09 ≤ 98.24	moderate reactivity	positive
> 17.28 ≤ 23.09	low reactivity	positive
> 10.50 ≤ 17.28	no to low reactivity	borderline ²
≤ 10.50	minimal or no reactivity	negative

¹ The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 6.38 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 6.38 ≤ 22.62 as “positive” (low reactivity).

² The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 13.89 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 13.89 ≤ 23.09 as “positive” (low reactivity).

3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure

For test substances that are not completely soluble by visual observation in the sample preparations containing the peptides immediately after preparation or after 24 hours, or when a gravimetric procedure is applied (with the exception of application of the undiluted test substance), the result may be under-predictive due to limited availability of the test substance. In this case mean peptide reactivity < 8.11% (Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model) or < 17.28% (Cysteine 1:10 prediction model) is interpreted as “inconclusive”. However, a mean peptide depletion > 8.11% or > 17.28% is considered as “positive”.

3.11. HISTORIC CONTROL DATA

Historic control values of negative and positive controls, gathered over an appropriate time period, are presented in section 4.6. These data demonstrate the reproducibility of results and robustness of the procedures. They are used to derive suitable acceptance criteria (see section 3.9) for the test system.

4. RESULTS

For sample chromatograms of the vehicle control, co-elution control and test-substance samples see Appendix.

4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE

4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
C: Calib. 1	0.534	721.2	17.1	42.2		
C: Calib. 2	0.267	357.9	8.7	41.1	Slope:	1343.7
C: Calib. 3	0.134	183.1	4.2	43.6	Axis intercept:	2.896
C: Calib. 4	0.067	101.1	n.a.	-	Correlation:	0.99987
C: Calib. 5	0.033	46.4	n.a.	-		
C: Calib. 6	0.017	23.2	n.a.	-		
C: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

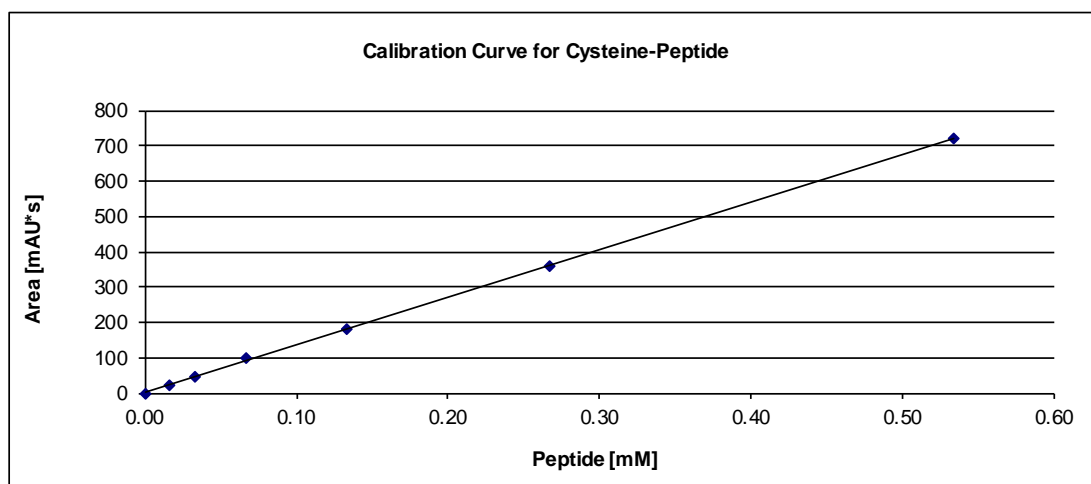


Figure 1: Calibration curve for Cysteine peptide

4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.491 mM with a SD of 0.009 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.475 mM with a SD of 0.002 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.478 mM with a SD of 0.002 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.4%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.1.3.

4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

Table 5: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	646.8	645.9	643.7	0.479	0.479	0.477	0.478	0.001
o-Kresylglycidylether	132.1	124.8	111.5	0.096	0.091	0.081	0.089	0.008
PC: EGDMA in ACN	354.8	339.4	327.6	0.262	0.250	0.242	0.251	0.010

Reaction with cysteine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	-0.21	-0.07	0.28	0.00	0.25
o-Kresylglycidylether	79.90	81.02	83.10	81.34	1.62
PC: EGDMA in ACN	45.23	47.63	49.47	47.45	2.12

Table 6: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	16.3	16.4	16.3	39.7	39.4	39.4
o-Kresylglycidylether	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
PC: EGDMA in ACN	8.8	8.5	8.2	40.4	39.8	40.1

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 39.6.

For the test substance calculation of an area ratio 220 nm/ 258 nm was not possible due to small peak values.

4.2. LYSINE-CONTAINING PEPTIDE

4.2.1. Lysine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
K: Calib. 1	0.534	567.7	14.0	40.6		
K: Calib. 2	0.267	289.5	7.2	40.2	Slope:	1059.4
K: Calib. 3	0.134	148.3	n.a.	-	Axis intercept:	4.264
K: Calib. 4	0.067	80.1	n.a.	-	Correlation:	0.99986
K: Calib. 5	0.033	37.7	n.a.	-		
K: Calib. 6	0.017	20.3	n.a.	-		
K: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

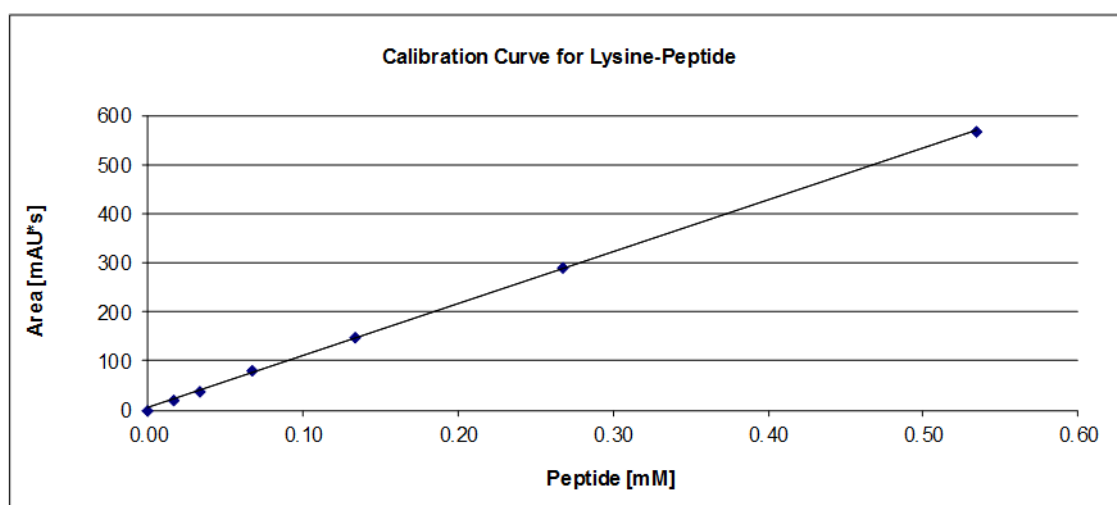


Figure 2: Calibration curve for Lysine peptide

4.2.2. Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.493 mM with a SD of 0.002 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.502 mM with a SD of 0.003 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.503 mM with a SD of 0.004 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.6%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.2.3.

4.2.3. Reaction with lysine-peptide

Table 7: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	536.4	535.2	530.5	0.502	0.501	0.497	0.500	0.003
o-Kresylglycidylether	n.a.	n.a.	n.a.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PC: EGDMA in ACN	476.5	479.6	477.0	0.446	0.449	0.446	0.447	0.002

Reaction with lysine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	-0.44	-0.22	0.66	0.00	0.58
o-Kresylglycidylether	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
PC: EGDMA in ACN	10.86	10.27	10.77	10.63	0.32

Table 8: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	13.9	14.2	13.6	38.5	37.6	38.9
o-Kresylglycidylether	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
PC: EGDMA in ACN	13.2	13.3	13.1	36.1	36.1	36.5

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 38.9.

For the test substance calculation of an area ratio 220 nm/ 258 nm was not possible due to small peak values.

4.3. SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES

The test substance was soluble in acetonitrile. The samples of the test substance with the C-peptide were solutions at the time of preparation and after 24 hours. The samples of the test substance with the K-peptide were emulsions at the time of preparation and after 24 hours.

4.4. CO-ELUTION

Due to small peak values, area ratios 220 nm/258 nm could not be calculated for both reactions (see sections 4.1.3 and 4.2.3). However, no co-elution of the test substance and peptides occurred as demonstrated by the chromatograms of the co-elution controls in the Appendix.

4.5. MEAN PEPTIDE DEPLETION

As the K-peptide depletion was 100.00% no under-prediction of the reaction can be present although the samples of the K-peptide were no solutions. Hence, mean peptide depletion was calculated and evaluation performed according to the cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model.

Table 9: Mean peptide depletions of Cysteine, Lysine and both peptides.

	Cysteine-Peptide		Lysine-Peptide		mean of both depletions [%]
	mean depletion [%]	SD [%]	mean depletion [%]	SD [%]	
o-Kresylglycidylether	81.34	1.62	100.00	0.00	90.67
PC: EGDMA in ACN	47.45	2.12	10.63	0.32	29.04

4.6. HISTORIC CONTROL DATA

The acceptance criteria mentioned in section 3.9 were met.

The positive control caused depletion of both peptides is comparable to historic data as can be seen in the following tables:

Table 10: Historic control data of negative control / vehicle control.

Acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	K-peptide concentration [mM]
Min	0.447	0.451
Max	0.542	0.541
Mean	0.484	0.503
SD	0.017	0.014
n	49	51

Table 11: Historic control data of positive control.

EGDMA, 50 mM in acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	C-peptide depletion [%]	K-peptide concentration [mM]	K-peptide depletion [%]
Min	0.058	43.32	0.373	7.99
Max	0.282	88.30	0.489	25.24
Mean	0.211	56.36	0.429	15.27
SD	0.040	8.09	0.024	3.23
n		31		31

5. CONCLUSION

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **o-Kresylglycidylether, CAS No.: 2210-79-9, shows a high chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

6. VALIDITY CRITERIA / REFERENCES

Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Eltze 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(3):489-504.

Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittenvin JP. (2007) Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicological Sciences* 97(2), 417-427.

OECD 2012: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins (2012) OECD ENVIRONMENT, HEALTH AND SAFETY PUBLICATIONS: No.168; ENV/JM/MONO(2012)10
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en) last accessed 05 Feb 2013.

OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle SN, Landsiedel R, Jaworska J, Kern P, 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. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71(2), 135-352.

7. LIST OF ABBREVIATIONS

The following list contains abbreviations and definitions generally used in reports for this study type. This report will not necessarily use all expressions listed below.

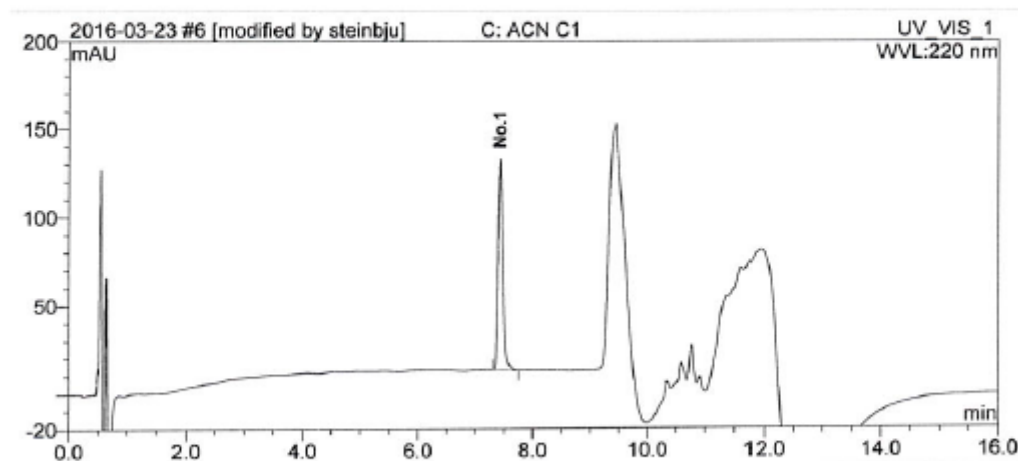
A	= alanine
AC	= acetone
Ac	= acetyl group
ACN	= acetonitrile
approx..	= approximately
C	= cysteine
ca.	= circa
Calib.	= calibration sample
cm	= centimeter
cm ²	= square centimeter
COOH	= carboxyl group
CV	= coefficient of variation
d	= day
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DTT	= dithiothreitol
EGDMA	= ethylene glycol dimethacrylate
F	= phenylalanine
G; g	= gram
h	= hour
IPA	= isopropyl alcohol (isopropanol)
K	= lysine
M	= mol / liter
mAU	= milli absorbance units
MeOH	= methanol
mg	= milligram
µg	= microgram
Min, min	= minute(s)
µL	= microliter
mL	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimol / liter
µm	= micrometer
MW	= Molecular weight

n.a.	= not assigned
NC	= negative control
No.; no.	= number
nm	= nanometer
p.a.	= per analysis
PC	= positive control
PrOH	= propanol
R	= arginine
SD	= standard deviation
SK	= co-elution control (Substanzkontrolle)
STD	= standard
TFA	= trifluoroacetic acid
UV	= ultraviolet
v/v	= volume / volume
Symbols:	
°C	= degree Celsius
~	= circa
=	= analogous
%	= per cent
∅	= diameter

APPENDIX

SAMPLE CHROMATOGRAMS

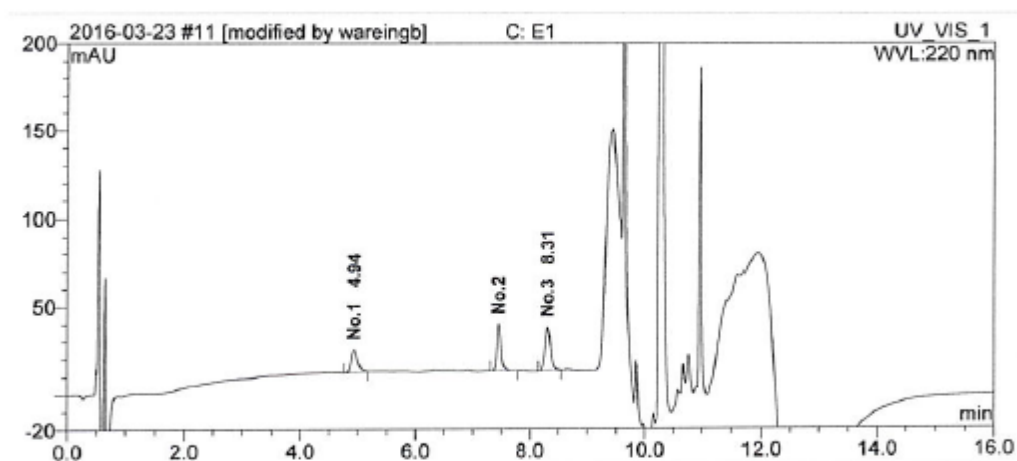
Sample Name:	C: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	23/03/16 11:47
Vial Number:	RA5	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	7.4275	646.809	119.418		100.0

Figure 3: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the C-containing peptide

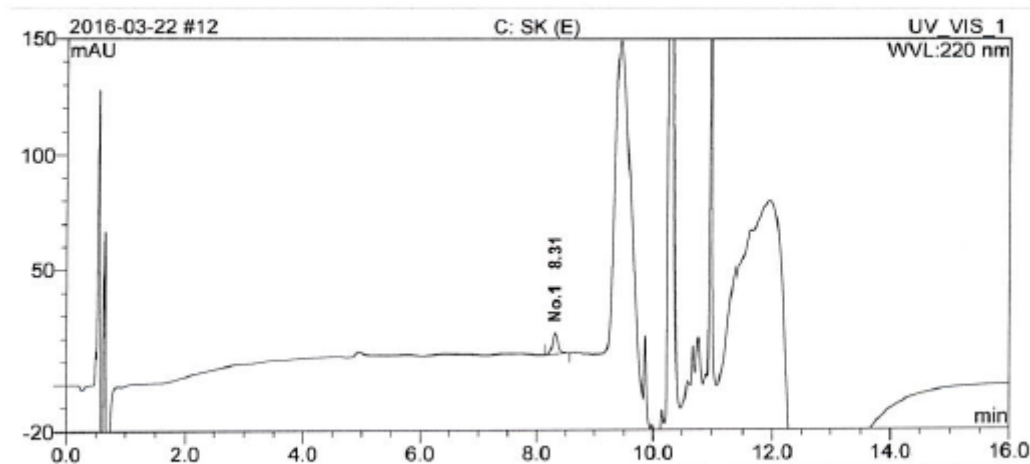
Sample Name:	C: E1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	23/03/16 13:11
Vial Number:	RB2	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	4.9358	99.619	12.589		25.1
2	7.4550	132.055	26.159		33.3
3	8.3092	164.715	24.620	396.389	41.6

Figure 4: Test substance incubated with the C-containing peptide

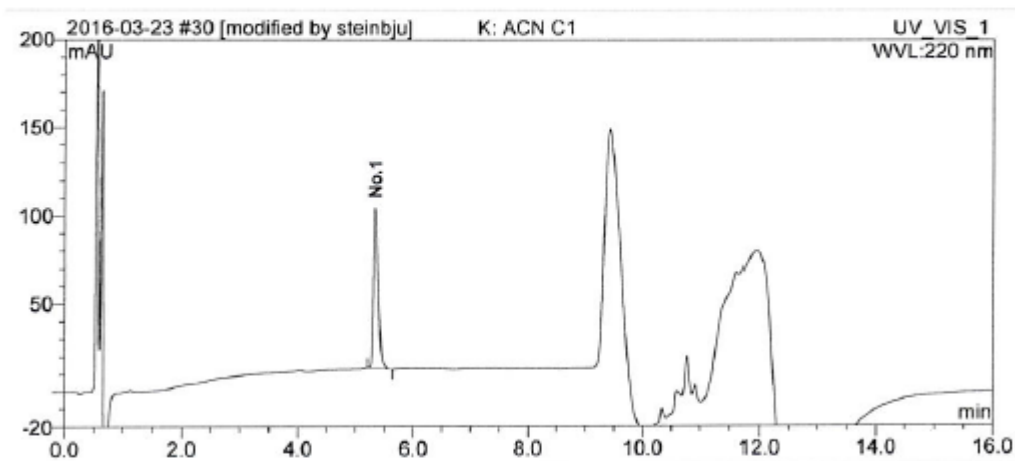
Sample Name:	C: SK (E)		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	22/03/16 14:23
Vial Number:	RB3	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	8.3142	62.004	9.097		100.0

Figure 5: Co-elution control (sample in pH 7.5 phosphate buffer)

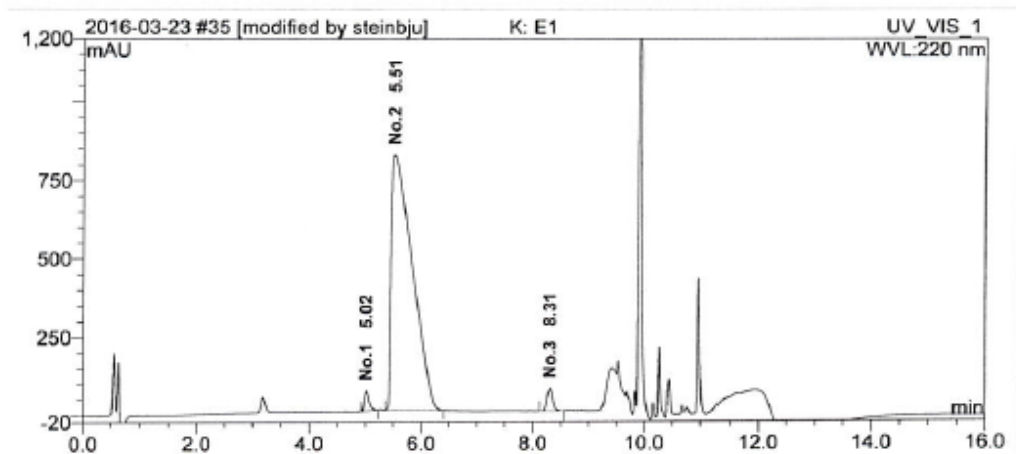
Sample Name:	K: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	23/03/16 18:32
Vial Number:	RD5	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.3317	536.365	90.916		100.0

Figure 6: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the K-containing peptide

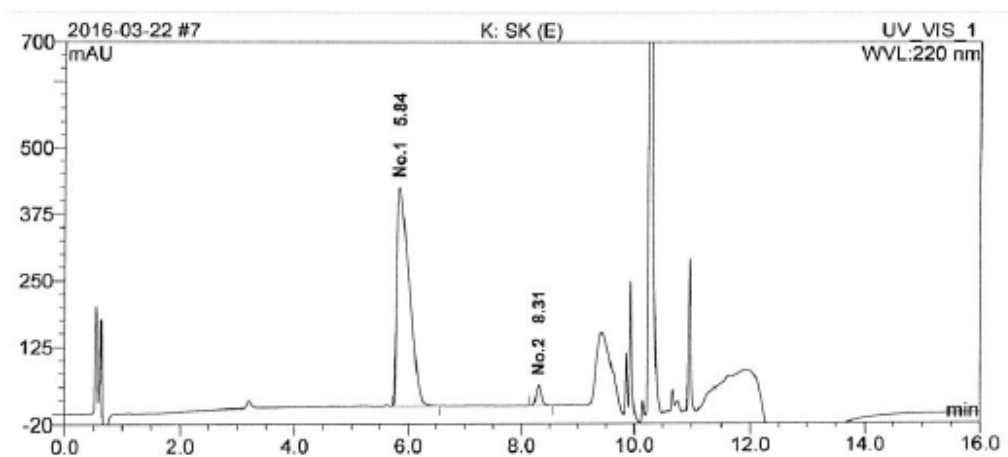
Sample Name:	K: E1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RE2	Recording Time:	23/03/16 19:56
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.0167	366.162	65.120		1.7
2	5.5133	21029.353	813.473		96.1
3	8.3100	485.523	72.270	21881.038	2.2

Figure 7: Test substance incubated with the K-containing peptide

Sample Name:	K: SK (E)		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RA6	Recording Time:	22/03/16 12:59
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.8367	6182.756	411.001		96.0
2	8.3125	254.437	38.452	6437.193	4.0

Figure 8: Co-elution control (sample in pH 10.2 ammonium acetate buffer)

ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE

Certificate of Analysis

L 15/0576-1
erg. 12.01.16 TS**SIGMA-ALDRICH**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

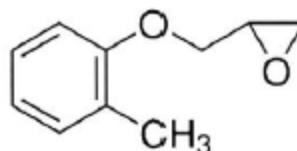
Website: www.sigmaaldrich.comEmail USA: techserv@sial.comOutside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:

Glycidyl 2-methylphenyl ether – technical grade, 90%

Product Number: 340146
Batch Number: MKBP7140V
Brand: ALDRICH
CAS Number: 2210-79-9
MDL Number: MFCD00037847
Formula: C₁₀H₁₂O₂
Formula Weight: 164.2 g/mol
Quality Release Date: 12 JUL 2013



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (GC)	≥ 89.0 %	91.3 %

Jamie Gleason, Manager
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

STUDY TITLE

Report

**1,4-Butanol-DGE
CAS No.: 2425-79-8**In Vitro Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay
(DPRA Test)**TEST GUIDELINE(S)**

OECD 442C

AUTHOR(S)

B. Wareing B.Sc. (Study Director)

STUDY COMPLETION DATE

24 May 2016

TEST FACILITY

BASF SE

Experimental Toxicology and Ecology
67056 Ludwigshafen, Germany**TEST FACILITY PROJECT IDENTIFICATION**

Project No.: 64V0577/15A200

SPONSORForschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Klarastraße 63
79106 Freiburg, Germany

This document contains manufacturing and trade secrets of the Sponsor(s). It is the property of the Sponsor(s) and may be used only for that purpose for which it was intended by the Sponsor(s). Every other or additional use, exploitation, reproduction, publication or submission to other parties require the written permission of the Sponsor(s), with the exception of regulatory agencies acting within the limits of their administrative authority.

SIGNATURE PAGE

Study Director:

B. Wareing 24 May 2016
B. Wareing B.Sc.

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

Head of Experimental Toxicology and Ecology:

Prof. Dr. rer. nat. B. v. Ravenzwaay

Test Facility Management:

Dr. rer. nat. R. Landsiedel

Study director:

B. Wareing B.Sc.

Applied Alternative Methods:

B. Wareing B. Sc.

CONTENTS

TITLE PAGE

SIGNATURE PAGE

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

CONTENTS

1. SUMMARY
2. INTRODUCTION
 - 2.1. OBJECTIVES
 - 2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS
 - 2.3. TEST GUIDELINES
 - 2.4. TIME SCHEDULE
3. MATERIALS AND METHODS
 - 3.1. TEST ITEM
 - 3.2. TEST SYSTEM
 - 3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT
 - 3.4. CONTROLS
 - 3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION
 - 3.6. ANALYSES
 - 3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE
 - 3.7.1. Test substance solubility
 - 3.7.2. Preparation of peptide stock solutions
 - 3.7.2.1. Preparation of calibration samples
 - 3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples
 - 3.7.3. Preparation of the vehicle controls
 - 3.7.4. Preparation of the co-elution control
 - 3.7.5. Measurement of peptide concentrations
 - 3.8. DATA EVALUATION
 - 3.8.1. Calculation of the peptide concentrations
 - 3.8.2. Calculation of the peptide depletion
 - 3.9. ACCEPTANCE CRITERIA
 - 3.10. EVALUATION OF RESULTS
 - 3.10.1. Peptide depletion
 - 3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure
 - 3.11. HISTORIC CONTROL DATA
4. RESULTS
 - 4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE
 - 4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve
 - 4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile
 - 4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

4.2.	LYSINE-CONTAINING PEPTIDE
4.2.1.	Lysine-peptide calibration curve
4.2.2.	Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile
4.2.3.	Reaction with lysine-peptide
4.3.	SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES
4.4.	CO-ELUTION
4.5.	MEAN PEPTIDE DEPLETION
4.6.	HISTORIC CONTROL DATA
5.	CONCLUSION
6.	VALIDITY CRITERIA / REFERENCES
7.	LIST OF ABBREVIATIONS
APPENDIX	
SAMPLE CHROMATOGRAMS	
ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE	
Certificate of Analysis	

1. SUMMARY

The reactivity of **1,4-Butanol-DGE, CAS No.: 2425-79-8**, towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides was evaluated in the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). For this purpose the test substance was incubated with synthetic peptides for ca. 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The test substance was dissolved at a 100 mM concentration in acetonitrile. Three samples of the test substance were incubated with each peptide in ratios of 1:10 (for C-peptide) or 1:50 (for K-peptide). Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides.

Further, a co-elution control was assessed in order to detect possible interference of the test substance with the peptides. The samples consisted of the test substance, vehicle and the respective peptide buffer but without peptide. Moreover the samples were analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm and the area ratio 220 nm/ 258 nm was calculated as a measure of peak purity.

The following results were obtained in the DPRA:

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were solutions. Visual observation after the 24-hour incubation time did not reveal precipitates in any samples of the test substance with the peptides.

No co-elution of test substance and peptides was noticed.

The mean C-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 86.64%. The mean K-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 18.21%.

Thus, the mean peptide depletion was calculated to be 52.42%.

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **1,4-Butanol-DGE, CAS No.: 2425-79-8, shows a high chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

2. INTRODUCTION

2.1. OBJECTIVES

Chemical reactivity has been shown to be well associated with allergenic potency (Gerberick et al., 2007) and has been described as the molecular initiating event in the OECD adverse outcome pathway (OECD Publication No.168; ENV/JM/MONO(2012)10). Within this context measuring the amount of proteins with nucleophilic side chains such as cysteine or lysine residues after incubation with putative allergens serves as surrogate markers.

In the DPRA the reactivity of a test item (=test substance) towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides is evaluated. For this purpose the test substance is incubated with synthetic peptides for 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentration is determined thereafter by high performance liquid chromatography with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The peptide depletion of test-substance incubated samples is compared to the peptide depletion of the NC samples and expressed as relative peptide depletion.

Due to the complexity of the skin sensitization process a single in vitro assay is not sufficient to adequately assess this toxicological endpoint. Therefore, a combination of several methods addressing two major steps of the sensitization process: protein reactivity and activation of dendritic cells has been proposed in a strategy to assess the sensitizing potential (Bauch et al. 2012, Urbisch et al. 2015).

2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

2.3. TEST GUIDELINES

The study was conducted based on the following test guideline:

- OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

2.4. TIME SCHEDULE

Test dates:	Experimental starting date (1 st weighing of test substance for sample preparation)	16 Mar 2016
	Sample preparation (C- and K-peptide)	16 Mar 2016
	Experimental completion date (documentation of check of raw data)	23 Mar 2016

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. TEST ITEM

The test item (= test substance) was used with the given specifications of the producer (Sigma – Aldrich). No further analyses were conducted.

Name of test substance:	1,4-Butanol-DGE
Test-substance No.:	15/0577-1
Batch identification:	MKBS1346V
CAS No.:	2425-79-8
Purity:	96.9% (see Certificate of Analysis in the Appendix, used for calculation of 100 mM preparation).
Identity:	Confirmed (see Certificate of Analysis in the Appendix)
Homogeneity:	The test substance was homogeneous by visual inspection.
Date of expiry:	05 Jan 2017

ADDITIONAL TEST-SUBSTANCE INFORMATION

Physical state / color:	Liquid / colorless, clear
Molecular weight:	202.25 g/mol
Log K _{ow} :	-0.268 (information taken from MSDS)
Proposed reaction mechanism for protein binding by OECD toolbox:	The OECD toolbox proposed the following reaction mechanism for protein binding for either the substance or its predicted metabolites (auto-oxidation, hydrolysis, and skin metabolism): nucleophilic substitution

3.2. TEST SYSTEM

Synthetic peptides: Cysteine- (C-) containing peptide:
Ac-RFAACAA-COOH (MW=751.9 g/mol)
Lysine- (K-) containing peptide:
Ac-RFAAKAA-COOH (MW=776.2 g/mol)
The peptides are custom material (Supplier: GenScript, Picataway, NJ, USA and/or RS Synthesis, Louisville KY, USA) containing phenylalanine to aid in detection and either cysteine or lysine as the reactive center.

3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT

HPLC: Liquid chromatograph Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000 consisting of the following modules:

Pump: HPG-3400RS

Autosampler: WPS-3000TSL

Column oven: TCC-3000

UV-Detector: DAD-3000

Column: ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 µm with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)

HPLC mobile phase A: H₂O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V

HPLC mobile phase B: ACN/H₂O/TFA 950/50/0.85 V/V/V

Incubator: Midi 40 Incubator (Thermo Scientific)

pH meter: Readability +/- 0.1 pH units.
For adjusting pH-values of buffers.

Reagents for preparing for pH 7.5 phosphate buffer (used for solving C-containing peptide):
the buffers:

Sodium phosphate, monobasic monohydrate, CAS no. 10049-21-5
(e.g. Sigma-Aldrich S9638)

Sodium phosphate, dibasic heptahydrate, CAS no. 7782-85-6
(e.g. Sigma-Aldrich S9390)

for pH 10.2 ammonium acetate buffer (used for solving K-containing peptide):

Ammonium acetate, CAS no. 631-61-8
(e.g. Sigma-Aldrich 32301)

Ammonium hydroxide, 28% – 30%, CAS no. 1336-21-6
(e.g. Sigma-Aldrich 320145)

3.4. CONTROLS

Negative control (NC): vehicle control = acetonitrile

Positive control (PC): Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA; CAS-no. 97-90-5), prepared as a 50 mM solution in acetonitrile.

Co-elution control: Sample prepared of the respective peptide buffer and the test substance but without peptide.

3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION

The test substance solution was prepared on a weight per volume basis within 4 hours of performing the assay (preparation of samples).

Test-substance preparation: The test substance was prepared as a 100 mM solution in acetonitrile. After short stirring the test substance was soluble in the vehicle.

Vehicle: acetonitrile

Reason for the vehicle: The test substance was soluble in acetonitrile.

3.6. ANALYSES

Because the test-substance preparation was incubated with the peptide shortly after preparation, no analysis of the test substance in the vehicle was performed.

3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE

The test substance was dissolved in a suitable vehicle. Three samples of the test substance were incubated with each peptide. Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides. The remaining non-depleted peptide concentration was determined thereafter by HPLC with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

In addition calibration samples of known peptide concentration, prepared from the respective peptide stock solution used for test-substance incubation, were measured in parallel with the same analytical method.

3.7.1. Test substance solubility

Prior to the assay the solubility of the test substance was tested. A suitable non-reactive, water-miscible solvent which dissolves the test substance completely (no visible precipitation or cloudiness of the test-substance preparation) should be used. The preferred solvent was acetonitrile. When not soluble in acetonitrile solutions in water, isopropanol, acetone, propanol, methanol or mixtures of these solvents were tried.

3.7.2. Preparation of peptide stock solutions

Peptide stock solutions in a concentration of 0.667 mM were prepared in pH 7.5 phosphate buffer (C-containing peptide) or pH 10.2 ammonium acetate buffer (K-containing peptide). The peptide stock solution was used for preparing the calibration samples and the test-substance and control samples.

3.7.2.1. Preparation of calibration samples

The following calibration samples were prepared from the peptide stock solutions in 20% acetonitrile:buffer (= dilution buffer) using serial dilution:

Table 1: Calibration samples of DPRA.

	Calib. 1	Calib. 2	Calib. 3	Calib. 4	Calib. 5	Calib. 6	Dilution buffer
mM peptide	0.534	0.267	0.134	0.067	0.033	0.017	0.000

The analysis of the calibration samples was started before analysis of the test-substance samples.

3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples

The samples were prepared in triplicates for each peptide.

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

The samples were prepared in suitable tubes, capped tightly and incubated at 25°C ± 2.5°C in the dark for 24 +/- 2 hours. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period. The HPLC analysis of the batch of samples started about 24 hours after sample preparation and the analysis time itself did not exceed 30 hours.

3.7.3. Preparation of the vehicle controls

Several acetonitrile controls were prepared in triplicates in the same way as the test-substance samples described above but with acetonitrile instead of the test substance: One set (set A) was analyzed together with the calibration samples without incubation and serves as a performance control. Another three sets (two sets B and set C) were prepared and incubated with the samples. Sets B were placed at the very start and ending of the sample list and serve as stability control of the peptide over the analysis time. Set C was analyzed with the samples and serves for calculation of the peptide depletion of any chemical formulated in acetonitrile.

3.7.4. Preparation of the co-elution control

The co-elution control was prepared in the same way as the test-substance samples described above but without the peptide. Instead the respective peptide buffer was used. The samples were analyzed together with the calibration samples. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period.

3.7.5. Measurement of peptide concentrations

The analyses of the samples were performed via HPLC under the following conditions:

Table 2: HPLC conditions used for analysis of DPRA samples.

Column:	ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 µm with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)														
Eluent:	A: H2O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V B: ACN/H2O/TFA 950/50/0.85 V/V/V														
Flow:	0.50 mL/min														
Gradient:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>time [min]</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>8.1</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.1</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	time [min]	%B	0	5	8	20	8.1	90	10	90	10.1	5	16	5
time [min]	%B														
0	5														
8	20														
8.1	90														
10	90														
10.1	5														
16	5														
Wavelength:	220 nm and 258 nm														
Injection volume:	2 µL														
Software:	Dionex Chromeleon														

3.8. DATA EVALUATION

Table(s) and/or figure(s) of measured parameters presented in the report were produced using PC based tabular calculation software. The mean and individual data were not always rounded but the significant digits were produced by changing the display format. As a consequence, calculation of mean values using the individual data presented in the report will, in some instances, yield minor variations in value.

The integrated peak areas were transferred electronically into EXCEL data spreadsheets to carry out the necessary calculations.

Some test substances or reaction products may co-eluate with the peptides. In these cases where proper integration and calculation of peptide depletion was not possible, the result for the respective peptide is reported as interference.

When samples were additionally analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm, the area ratio 220 nm/ 258 nm may be calculated and serve as a measure of peak purity. The ratio of a pure peptide peak should be consistent over all samples (100% ± 10% of the mean of the vehicle controls). However, due to small peak areas calculation of the area ratio may not be possible for all samples.

3.8.1. Calculation of the peptide concentrations

For each peptide a calibration curve was generated from the measured peak areas of the calibration samples of known peptide concentration.

The peptide concentration of the samples was calculated with the respective calibration curve using linear regression (b = axis intercept; m = slope).

$$\text{Peptide concentration [mM]} = \frac{\text{peak area [mAU} \times s] - b}{m}$$

3.8.2. Calculation of the peptide depletion

The peptide depletion of a sample was calculated as follows:

$$\text{Peptide depletion of sample} = \left[1 - \frac{\text{peptide concentration of sample (mM)}}{\text{mean peptide concentration of NC (mM)}} \right] \times 100 \quad [\%]$$

The mean peptide depletion for each of the two peptides was calculated as the mean value of the three samples conducted for each peptide and test substance (C-containing and K-containing peptide depletion; example calculation for C-containing peptide):

$$\text{C - containing peptide depletion of a test substance [\%]} = \text{mean [C - containing peptide depletion of samples 1 - 3] [\%]}$$

When a negative value for C- or K-peptide depletion was obtained the value was considered zero for calculation of the mean peptide depletion.

The mean peptide depletion of a test substance was calculated as the mean value of C-containing peptide depletion and K-containing peptide depletion:

$$\text{Mean peptide depletion [\%]} = \frac{\text{C-containing peptide depletion [\%]} + \text{K-containing peptide depletion [\%]}}{2}$$

3.9. ACCEPTANCE CRITERIA

If any of the acceptance criteria mentioned below is not met, repetition of the test is considered. In the case of an unambiguous result the study director may decide that an experiment is valid despite a deviation of acceptance criteria. However, reasonable justification must then be given.

The standard calibration curve should have an $r^2 > 0.99$.

The negative control (vehicle control) samples of sets A and C should be 0.50 mM +/- 0.05 mM.

The CV of the nine vehicle controls B and C should be < 15%.

Since the mean peptide depletion for each peptide is determined from the mean of three single samples, the variability between these samples should be acceptably low (SD <14.9% for % cysteine depletion and <11.6% for % lysine depletion).

In addition, the positive control should cause depletion of both peptides comparable to historic data.

3.10. EVALUATION OF RESULTS

3.10.1. Peptide depletion

Chemical reactivity was determined by mean peptide depletion [%] and was rated as high, moderate, low, or minimal.

Table 3: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model.

Mean peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 42.47	high reactivity	positive
> 22.62 ≤ 42.47	moderate reactivity	positive
> 8.11 ≤ 22.62	low reactivity	positive
> 4.65 ≤ 8.11	no to low reactivity	borderline ¹
≤ 4.65	minimal or no reactivity	negative

In the case mean peptide depletion [%] cannot be determined due to invalid K-peptide depletion (e.g. insolubility of the K-peptide samples or interference in the samples of the K-peptide) but valid C-peptide depletion is available, evaluation is performed as follows:

Table 4: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 prediction model.

C peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 98.24	high reactivity	positive
> 23.09 ≤ 98.24	moderate reactivity	positive
> 17.28 ≤ 23.09	low reactivity	positive
> 10.50 ≤ 17.28	no to low reactivity	borderline ²
≤ 10.50	minimal or no reactivity	negative

¹ The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 6.38 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 6.38 ≤ 22.62 as “positive” (low reactivity).

² The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 13.89 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 13.89 ≤ 23.09 as “positive” (low reactivity).

3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure

For test substances that are not completely soluble by visual observation in the sample preparations containing the peptides immediately after preparation or after 24 hours, or when a gravimetric procedure is applied (with the exception of application of the undiluted test substance), the result may be under-predictive due to limited availability of the test substance. In this case mean peptide reactivity < 8.11% (Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model) or < 17.28% (Cysteine 1:10 prediction model) is interpreted as “inconclusive”. However, a mean peptide depletion > 8.11% or > 17.28% is considered as “positive”.

3.11. HISTORIC CONTROL DATA

Historic control values of negative and positive controls, gathered over an appropriate time period, are presented in section 4.6. These data demonstrate the reproducibility of results and robustness of the procedures. They are used to derive suitable acceptance criteria (see section 3.9) for the test system.

4. RESULTS

For sample chromatograms of the vehicle control, co-elution control and test-substance samples see Appendix.

4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE

4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
C: Calib. 1	0.534	688.9	17.5	39.3		
C: Calib. 2	0.267	356.4	8.7	41.1	Slope:	1292.5
C: Calib. 3	0.134	186.9	4.5	41.9	Axis intercept:	4.353
C: Calib. 4	0.067	90.6	n.a.	-	Correlation:	0.99970
C: Calib. 5	0.033	44.9	n.a.	-		
C: Calib. 6	0.017	21.6	n.a.	-		
C: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

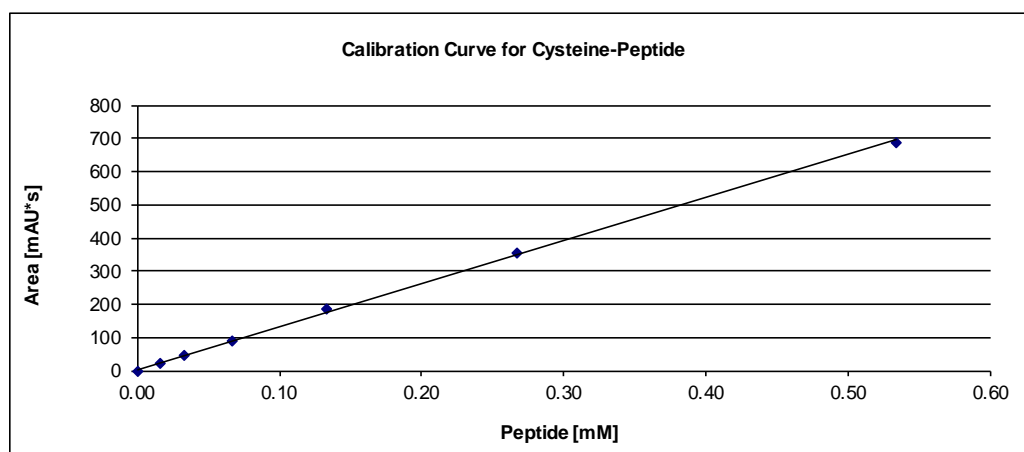


Figure 1: Calibration curve for Cysteine peptide

4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.501 mM with a SD of 0.002 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.497 mM with a SD of 0.005 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.494 mM with a SD of 0.006 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.9%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.1.3.

4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

Table 5: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	650.3	645.1	646.3	0.500	0.496	0.497	0.497	0.002
1,4-Butanol-DGE	102.7	88.9	79.2	0.076	0.065	0.058	0.066	0.009
PC: EGDMA in ACN	352.9	337.9	322.9	0.270	0.258	0.246	0.258	0.012

Reaction with cysteine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	-0.48	0.34	0.14	0.00	0.43
1,4-Butanol-DGE	84.70	86.85	88.36	86.64	1.84
PC: EGDMA in ACN	45.79	48.12	50.45	48.12	2.33

Table 6: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	16.4	16.3	16.4	39.7	39.5	39.5
1,4-Butanol-DGE	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
PC: EGDMA in ACN	9.0	8.6	8.2	39.3	39.3	39.5

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 39.4.

For the test substance calculation of an area ratio 220 nm/ 258 nm was not possible due to small peak values.

4.2. LYSINE-CONTAINING PEPTIDE

4.2.1. Lysine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
K: Calib. 1	0.534	556.1	14.3	39.0		
K: Calib. 2	0.267	285.9	7.3	39.2	Slope:	1040.6
K: Calib. 3	0.134	146.9	n.a.	-	Axis intercept:	3.598
K: Calib. 4	0.067	71.8	n.a.	-	Correlation:	0.99987
K: Calib. 5	0.033	38.3	n.a.	-		
K: Calib. 6	0.017	20.1	n.a.	-		
K: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

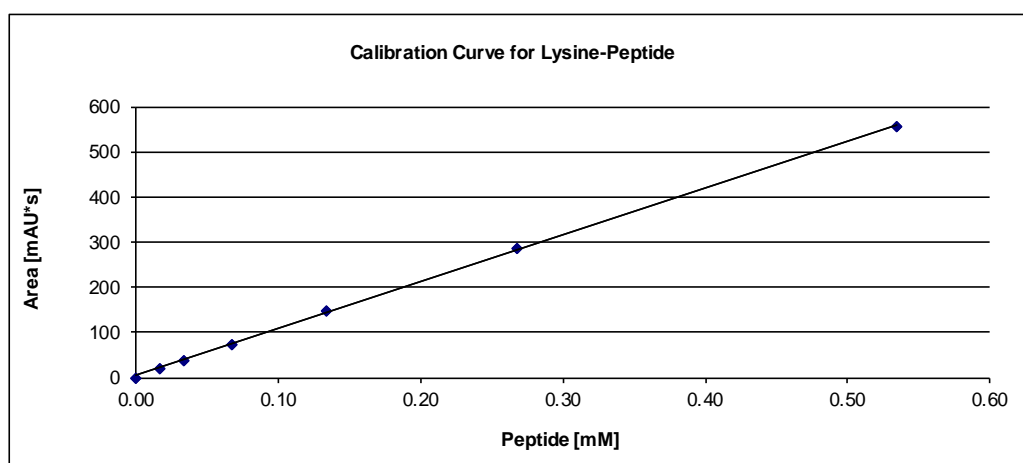


Figure 2: Calibration curve for Lysine peptide

4.2.2. Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.521 mM with a SD of 0.004 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.503 mM with a SD of 0.004 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.504 mM with a SD of 0.003 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 1.1%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.2.3.

4.2.3. Reaction with lysine-peptide

Table 7: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	527.6	542.2	527.9	0.504	0.518	0.504	0.508	0.008
1,4-Butanol-DGE	432.6	438.8	437.4	0.412	0.418	0.417	0.416	0.003
PC: EGDMA in ACN	471.6	470.4	471.7	0.450	0.449	0.450	0.449	0.001

Reaction with lysine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	0.94	-1.82	0.88	0.00	1.58
1,4-Butanol-DGE	18.91	17.73	17.99	18.21	0.62
PC: EGDMA in ACN	11.53	11.77	11.51	11.60	0.14

Table 8: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	12.7	12.5	12.8	41.7	43.3	41.1
1,4-Butanol-DGE	11.3	11.2	10.5	38.4	39.3	41.6
PC: EGDMA in ACN	11.9	11.9	11.9	39.6	39.4	39.5

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 40.4. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 95.1% to 102.9% of the mean of the vehicle controls.

4.3. SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were solutions. Visual observation after the 24-hour incubation time did not reveal precipitates in any samples of the test substance with the peptides.

4.4. CO-ELUTION

No co-elution of the test substance and peptides occurred as demonstrated by the consistent values of the area ratios 220 nm/258 nm (available for lysine only due to low area values of the cysteine-peaks; for values see sections 4.1.3 and 4.2.3) and chromatograms of the co-elution control in the Appendix.

4.5. MEAN PEPTIDE DEPLETION

The mean peptide depletion as average of cysteine- and lysine-peptide depletions is calculated and summarized in the table below.

Table 9: Mean peptide depletions of Cysteine, Lysine and both peptides.

	Cysteine-Peptide		Lysine-Peptide		mean of both depletions [%]
	mean depletion [%]	SD [%]	mean depletion [%]	SD [%]	
1,4-Butanol-DGE	86.64	1.84	18.21	0.62	52.42
PC: EGDMA in ACN	48.12	2.33	11.60	0.14	29.86

4.6. HISTORIC CONTROL DATA

The acceptance criteria mentioned in section 3.9 were met.

The positive control caused depletion of both peptides is comparable to historic data as can be seen in the following tables:

Table 10: Historic control data of negative control / vehicle control.

Acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	K-peptide concentration [mM]
Min	0.447	0.451
Max	0.542	0.541
Mean	0.484	0.503
SD	0.017	0.014
n	49	51

Table 11: Historic control data of positive control.

EGDMA, 50 mM in acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	C-peptide depletion [%]	K-peptide concentration [mM]	K-peptide depletion [%]
Min	0.058	43.32	0.373	7.99
Max	0.282	88.30	0.489	25.24
Mean	0.211	56.36	0.429	15.27
SD	0.040	8.09	0.024	3.23
n		31		31

5. CONCLUSION

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **1,4-Butanol-DGE, CAS No.: 2425-79-8, shows a high chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

6. VALIDITY CRITERIA / REFERENCES

Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Eltze 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(3):489-504.

Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittenvin JP. (2007) Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicological Sciences* 97(2), 417-427.

OECD 2012: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins (2012) OECD ENVIRONMENT, HEALTH AND SAFETY PUBLICATIONS: No.168; ENV/JM/MONO(2012)10
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en) last accessed 05 Feb 2013.

OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle SN, Landsiedel R, Jaworska J, Kern P, 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. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71(2), 135-352.

7. LIST OF ABBREVIATIONS

The following list contains abbreviations and definitions generally used in reports for this study type. This report will not necessarily use all expressions listed below.

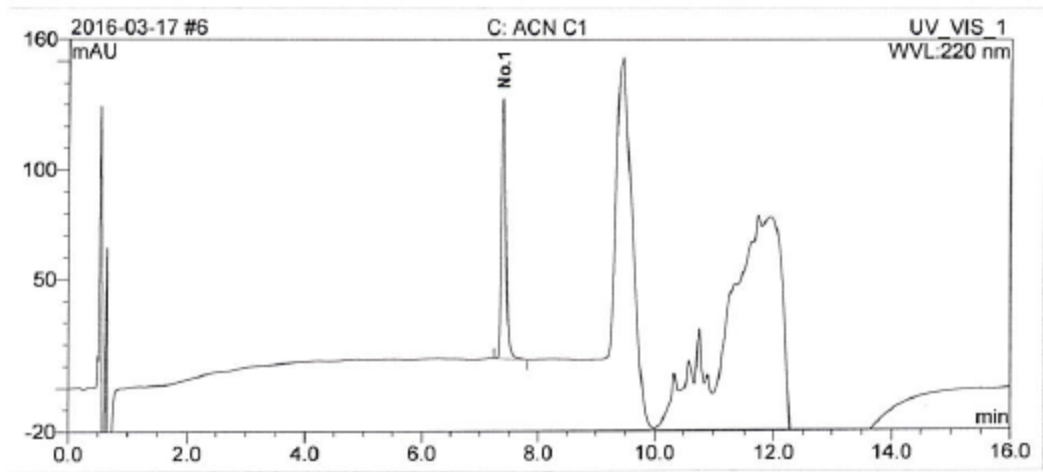
A	= alanine
AC	= acetone
Ac	= acetyl group
ACN	= acetonitrile
approx..	= approximately
C	= cysteine
ca.	= circa
Calib.	= calibration sample
cm	= centimeter
cm ²	= square centimeter
COOH	= carboxyl group
CV	= coefficient of variation
d	= day
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DTT	= dithiothreitol
EGDMA	= ethylene glycol dimethacrylate
F	= phenylalanine
G; g	= gram
h	= hour
IPA	= isopropyl alcohol (isopropanol)
K	= lysine
M	= mol / liter
mAU	= milli absorbance units
MeOH	= methanol
mg	= milligram
µg	= microgram
Min, min	= minute(s)
µL	= microliter
mL	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimol / liter
µm	= micrometer
MW	= Molecular weight

n.a.	= not assigned
NC	= negative control
No.; no.	= number
nm	= nanometer
p.a.	= per analysis
PC	= positive control
PrOH	= propanol
R	= arginine
SD	= standard deviation
SK	= co-elution control (Substanzkontrolle)
STD	= standard
TFA	= trifluoroacetic acid
UV	= ultraviolet
v/v	= volume / volume
Symbols:	
°C	= degree Celsius
~	= circa
=	= analogous
%	= per cent
∅	= diameter

APPENDIX

SAMPLE CHROMATOGRAMS

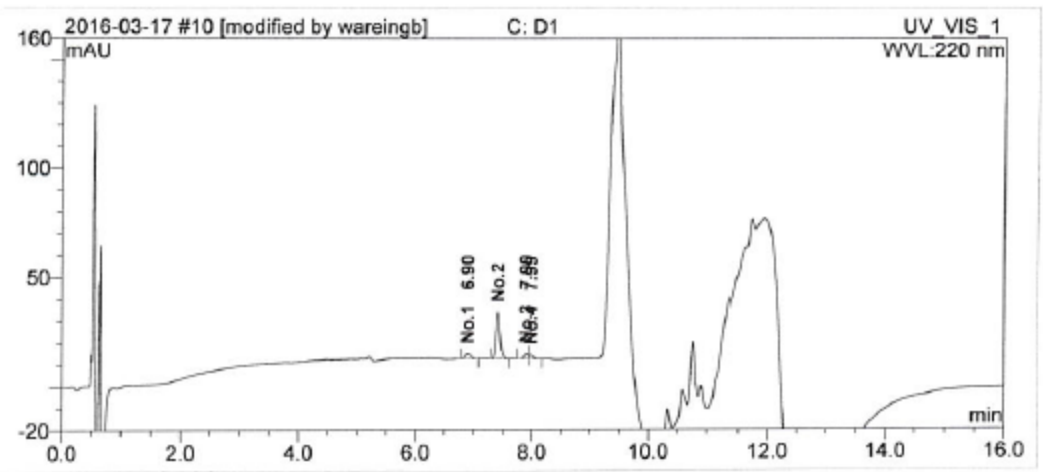
Sample Name:	C: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RA5	Recording Time:	17/03/16 12:20
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	7.3875	650.306	119.438		100.0

Figure 3: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the C-containing peptide

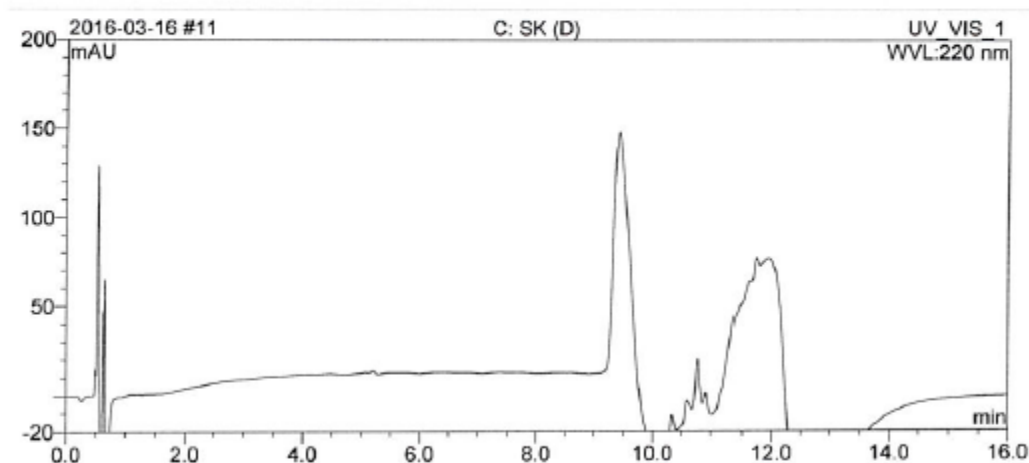
Sample Name:	C: D1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RB1	Recording Time:	17/03/16 13:28
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	6.9008	13.946	2.107		10.4
2	7.4142	102.725	21.020		76.8
3	7.9008	9.729	2.199		7.3
4	7.9850	7.361	1.563	133.761	5.5

Figure 4: Test substance incubated with the C-containing peptide

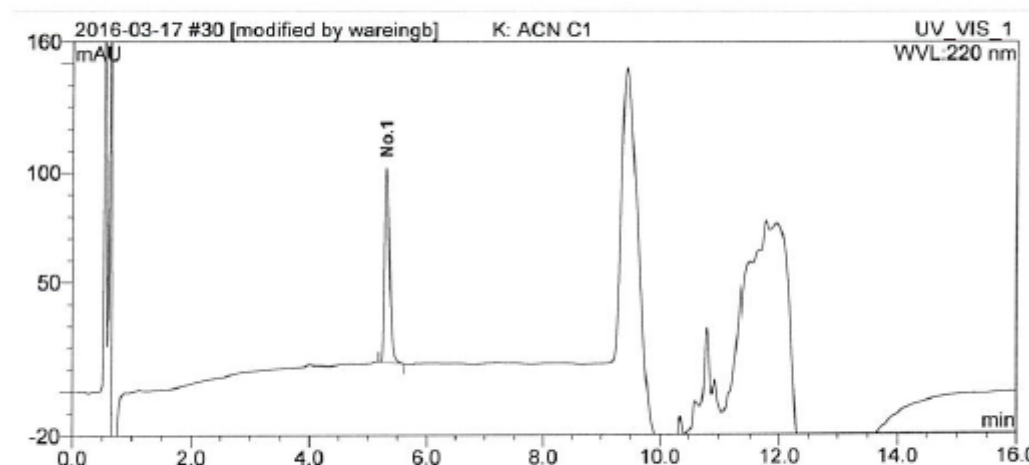
Sample Name:	C: SK (D)		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RB2	Recording Time:	16/03/16 14:59
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
-----	--------------	------------	------------	----------------	------------

Figure 5: Co-elution control (sample in pH 7.5 phosphate buffer)

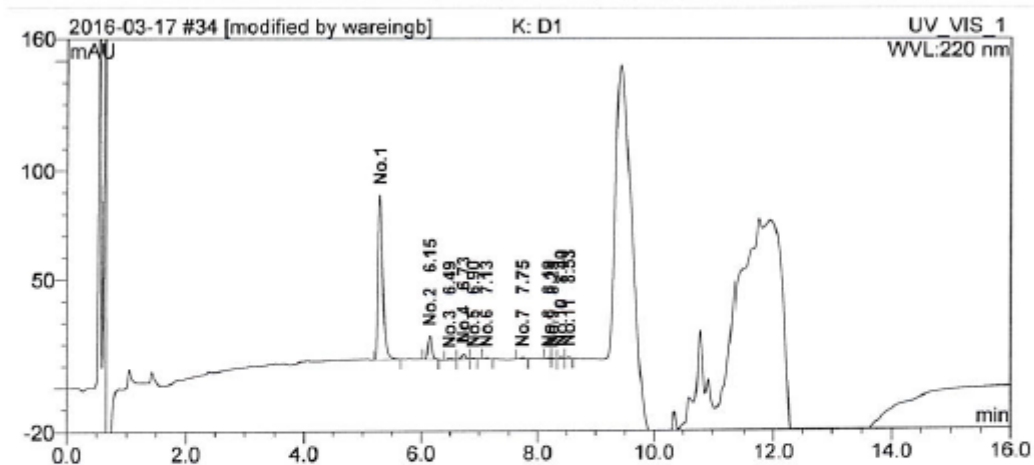
Sample Name:	K: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RD5	Recording Time:	17/03/16 19:05
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.3050	527.602	89.001		100.0

Figure 6: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the K-containing peptide

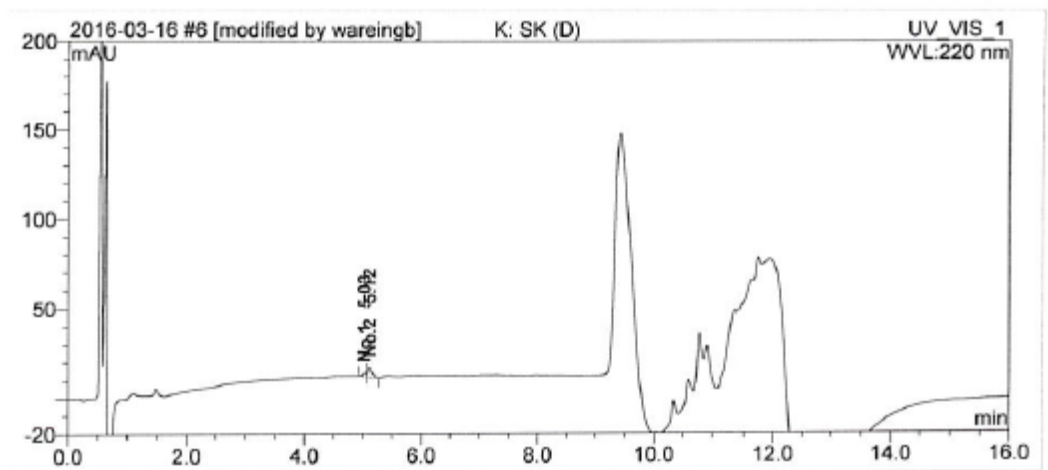
Sample Name:	K: D1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	17/03/16 20:13
Vial Number:	RE1	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret. Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel. Area %
1	5.2917	432.562	75.911		83.4
2	6.1492	48.707	10.794		9.4
3	6.4867	4.820	0.856		0.9
4	6.7292	12.578	2.606		2.4
5	6.9000	1.476	0.399		0.3
6	7.1258	2.253	0.553		0.4
7	7.7458	3.964	0.749		0.8
8	8.1867	2.951	0.727		0.6
9	8.2517	2.350	0.629		0.5
10	8.4025	3.717	1.031		0.7
11	8.5308	3.300	0.828	518.677	0.6

Figure 7: Test substance incubated with the K-containing peptide

Sample Name:	K: SK (D)		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RA5	Recording Time:	16/03/16 13:35
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret. Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel. Area %
1	5.0300	9.140	1.964		26.0
2	5.1150	26.027	5.347	35.167	74.0

Figure 8: Co-elution control (sample in pH 10.2 ammonium acetate buffer)

ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE

Certificate of Analysis

1510577-1
add
06/21/16 JB

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
1,4-Butanediol diglycidyl ether - ≥95%

Product Number: 220892
Batch Number: MKBS1346V
Brand: ALDRICH
CAS Number: 2425-79-8
MDL Number: MFCD00005146
Formula: C₁₀H₁₈O₄
Formula Weight: 202.25 g/mol
Quality Release Date: 20 AUG 2014



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (GC)	≥ 95.0 %	96.9 %

ali ataei

Ali Ataei, Manager
Quality Control
Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

STUDY TITLE

Report

**Neopentylglykol-DGE
CAS No.: 17557-23-2**In Vitro Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay
(DPRA Test)**TEST GUIDELINE(S)**

OECD 442C

AUTHOR(S)

B. Wareing B.Sc. (Study Director)

STUDY COMPLETION DATE

24 May 2016

TEST FACILITY

BASF SE

Experimental Toxicology and Ecology
67056 Ludwigshafen, Germany**TEST FACILITY PROJECT IDENTIFICATION**

Project No.: 64V0578/15A201

SPONSORForschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Klarastraße 63
79106 Freiburg, Germany

This document contains manufacturing and trade secrets of the Sponsor(s). It is the property of the Sponsor(s) and may be used only for that purpose for which it was intended by the Sponsor(s). Every other or additional use, exploitation, reproduction, publication or submission to other parties require the written permission of the Sponsor(s), with the exception of regulatory agencies acting within the limits of their administrative authority.

SIGNATURE PAGE

Study Director:

B. Wareing 24 May 2016
B. Wareing B.Sc.

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

Head of Experimental Toxicology and Ecology:

Prof. Dr. rer. nat. B. v. Ravenzwaay

Test Facility Management:

Dr. rer. nat. R. Landsiedel

Study director:

B. Wareing B.Sc.

Applied Alternative Methods:

B. Wareing B. Sc.

CONTENTS

TITLE PAGE

SIGNATURE PAGE

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

CONTENTS

1. SUMMARY
2. INTRODUCTION
 - 2.1. OBJECTIVES
 - 2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS
 - 2.3. TEST GUIDELINES
 - 2.4. TIME SCHEDULE
3. MATERIALS AND METHODS
 - 3.1. TEST ITEM
 - 3.2. TEST SYSTEM
 - 3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT
 - 3.4. CONTROLS
 - 3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION
 - 3.6. ANALYSES
 - 3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE
 - 3.7.1. Test substance solubility
 - 3.7.2. Preparation of peptide stock solutions
 - 3.7.2.1. Preparation of calibration samples
 - 3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples
 - 3.7.3. Preparation of the vehicle controls
 - 3.7.4. Preparation of the co-elution control
 - 3.7.5. Measurement of peptide concentrations
 - 3.8. DATA EVALUATION
 - 3.8.1. Calculation of the peptide concentrations
 - 3.8.2. Calculation of the peptide depletion
 - 3.9. ACCEPTANCE CRITERIA
 - 3.10. EVALUATION OF RESULTS
 - 3.10.1. Peptide depletion
 - 3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure
 - 3.11. HISTORIC CONTROL DATA
4. RESULTS
 - 4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE
 - 4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve
 - 4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile
 - 4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

4.2.	LYSINE-CONTAINING PEPTIDE
4.2.1.	Lysine-peptide calibration curve
4.2.2.	Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile
4.2.3.	Reaction with lysine-peptide
4.3.	SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES
4.4.	CO-ELUTION
4.5.	MEAN PEPTIDE DEPLETION
4.6.	HISTORIC CONTROL DATA
5.	CONCLUSION
6.	VALIDITY CRITERIA / REFERENCES
7.	LIST OF ABBREVIATIONS
APPENDIX	
SAMPLE CHROMATOGRAMS	
ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE	
Certificate of Analysis	

1. SUMMARY

The reactivity of **Neopentylglykol-DGE, CAS No.: 17557-23-2**, towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides was evaluated in the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). For this purpose the test substance was incubated with synthetic peptides for ca. 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The test substance was dissolved at a 100 mM concentration in acetonitrile. Three samples of the test substance were incubated with each peptide in ratios of 1:10 (for C-peptide) or 1:50 (for K-peptide). Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides.

Further, a co-elution control was assessed in order to detect possible interference of the test substance with the peptides. The samples consisted of the test substance, vehicle and the respective peptide buffer but without peptide. Moreover the samples were analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm and the area ratio 220 nm/ 258 nm was calculated as a measure of peak purity.

The following results were obtained in the DPRA:

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were solutions. Visual observation after the 24-hour incubation time did not reveal precipitates in any samples of the test substance with the peptides.

No co-elution of test substance and peptides was noticed.

The mean C-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 71.48%. The mean K-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 12.20%.

Thus, the mean peptide depletion was calculated to be 41.84%.

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **Neopentylglykol-DGE CAS No.: 17557-23-2, shows a moderate chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

2. INTRODUCTION

2.1. OBJECTIVES

Chemical reactivity has been shown to be well associated with allergenic potency (Gerberick et al., 2007) and has been described as the molecular initiating event in the OECD adverse outcome pathway (OECD Publication No.168; ENV/JM/MONO(2012)10). Within this context measuring the amount of proteins with nucleophilic side chains such as cysteine or lysine residues after incubation with putative allergens serves as surrogate markers.

In the DPRA the reactivity of a test item (=test substance) towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides is evaluated. For this purpose the test substance is incubated with synthetic peptides for 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentration is determined thereafter by high performance liquid chromatography with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The peptide depletion of test-substance incubated samples is compared to the peptide depletion of the NC samples and expressed as relative peptide depletion.

Due to the complexity of the skin sensitization process a single in vitro assay is not sufficient to adequately assess this toxicological endpoint. Therefore, a combination of several methods addressing two major steps of the sensitization process: protein reactivity and activation of dendritic cells has been proposed in a strategy to assess the sensitizing potential (Bauch et al. 2012, Urbisch et al. 2015).

2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

2.3. TEST GUIDELINES

The study was conducted based on the following test guideline:

- OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

2.4. TIME SCHEDULE

Test dates:	Experimental starting date (1st weighing of test substance for sample preparation)	16 Mar 2016
	Sample preparation (C- and K-peptide)	16 Mar 2016
	Experimental completion date (documentation of check of raw data)	23 Mar 2016

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. TEST ITEM

The test item (= test substance) was used with the given specifications of the producer (Sigma – Aldrich). No further analyses were conducted.

Name of test substance:	Neopentylglykol-DGE
Test-substance No.:	15/0578-1
Batch identification:	MKBR3896V
CAS No.:	17557-23-2
Purity / Contents:	As purity/contents was not available a purity of 100% was assumed and used for calculation of the 100 mM test-substance preparation.
Identity:	Confirmed (see Certificate of Analysis in the Appendix)
Homogeneity:	The test substance was homogeneous by visual inspection.
Date of expiry:	05 Jan 2017

ADDITIONAL TEST-SUBSTANCE INFORMATION

Physical state / color:	Liquid / colorless, clear
Molecular weight:	216.27 g/mol
Log K _{ow} :	0.23 (calculated)
Proposed reaction mechanism for protein binding by OECD toolbox:	The OECD toolbox proposed the following reaction mechanism for protein binding for either the substance or its predicted metabolites (auto-oxidation, hydrolysis, and skin metabolism): nucleophilic substitution

3.2. TEST SYSTEM

Synthetic peptides: Cysteine- (C-) containing peptide:
Ac-RFAACAA-COOH (MW=751.9 g/mol)
Lysine- (K-) containing peptide:
Ac-RFAAKAA-COOH (MW=776.2 g/mol)
The peptides are custom material (Supplier: GenScript, Picataway, NJ, USA and/or RS Synthesis, Louisville KY, USA) containing phenylalanine to aid in detection and either cysteine or lysine as the reactive center.

3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT

HPLC: Liquid chromatograph Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000 consisting of the following modules:

Pump: HPG-3400RS

Autosampler: WPS-3000TSL

Column oven: TCC-3000

UV-Detector: DAD-3000

Column: ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 μ m with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)

HPLC mobile phase A: H₂O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V

HPLC mobile phase B: ACN/H₂O/TFA 950/50/0.85 V/V/V

Incubator: Midi 40 Incubator (Thermo Scientific)

pH meter: Readability +/- 0.1 pH units.
For adjusting pH-values of buffers.

Reagents for preparing for pH 7.5 phosphate buffer (used for solving C-containing peptide):
the buffers:

Sodium phosphate, monobasic monohydrate, CAS no. 10049-21-5
(e.g. Sigma-Aldrich S9638)

Sodium phosphate, dibasic heptahydrate, CAS no. 7782-85-6
(e.g. Sigma-Aldrich S9390)

for pH 10.2 ammonium acetate buffer (used for solving K-containing peptide):

Ammonium acetate, CAS no. 631-61-8
(e.g. Sigma-Aldrich 32301)

Ammonium hydroxide, 28% – 30%, CAS no. 1336-21-6
(e.g. Sigma-Aldrich 320145)

3.4. CONTROLS

Negative control (NC): vehicle control = acetonitrile

Positive control (PC): Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA; CAS-no. 97-90-5), prepared as a 50 mM solution in acetonitrile.

Co-elution control: Sample prepared of the respective peptide buffer and the test substance but without peptide.

3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION

The test substance solution was prepared on a weight per volume basis within 4 hours of performing the assay (preparation of samples).

Test-substance preparation: The test substance was prepared as a 100 mM solution in acetonitrile. After short stirring the test substance was soluble in the vehicle.

Vehicle: acetonitrile

Reason for the vehicle: The test substance was soluble in acetonitrile.

3.6. ANALYSES

Because the test-substance preparation was incubated with the peptide shortly after preparation, no analysis of the test substance in the vehicle was performed.

3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE

The test substance was dissolved in a suitable vehicle. Three samples of the test substance were incubated with each peptide. Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides. The remaining non-depleted peptide concentration was determined thereafter by HPLC with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

In addition calibration samples of known peptide concentration, prepared from the respective peptide stock solution used for test-substance incubation, were measured in parallel with the same analytical method.

3.7.1. Test substance solubility

Prior to the assay the solubility of the test substance was tested. A suitable non-reactive, water-miscible solvent which dissolves the test substance completely (no visible precipitation or cloudyness of the test-substance preparation) should be used. The preferred solvent was acetonitrile. When not soluble in acetonitrile solutions in water, isopropanol, acetone, propanol, methanol or mixtures of these solvents were tried.

3.7.2. Preparation of peptide stock solutions

Peptide stock solutions in a concentration of 0.667 mM were prepared in pH 7.5 phosphate buffer (C-containing peptide) or pH 10.2 ammonium acetate buffer (K-containing peptide). The peptide stock solution was used for preparing the calibration samples and the test-substance and control samples.

3.7.2.1. Preparation of calibration samples

The following calibration samples were prepared from the peptide stock solutions in 20% acetonitrile:buffer (= dilution buffer) using serial dilution:

Table 1: Calibration samples of DPRA.

	Calib. 1	Calib. 2	Calib. 3	Calib. 4	Calib. 5	Calib. 6	Dilution buffer
mM peptide	0.534	0.267	0.134	0.067	0.033	0.017	0.000

The analysis of the calibration samples was started before analysis of the test-substance samples.

3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples

The samples were prepared in triplicates for each peptide.

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

The samples were prepared in suitable tubes, capped tightly and incubated at 25°C ± 2.5°C in the dark for 24 +/- 2 hours. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period. The HPLC analysis of the batch of samples started about 24 hours after sample preparation and the analysis time itself did not exceed 30 hours.

3.7.3. Preparation of the vehicle controls

Several acetonitrile controls were prepared in triplicates in the same way as the test-substance samples described above but with acetonitrile instead of the test substance: One set (set A) was analyzed together with the calibration samples without incubation and serves as a performance control. Another three sets (two sets B and set C) were prepared and incubated with the samples. Sets B were placed at the very start and ending of the sample list and serve as stability control of the peptide over the analysis time. Set C was analyzed with the samples and serves for calculation of the peptide depletion of any chemical formulated in acetonitrile.

3.7.4. Preparation of the co-elution control

The co-elution control was prepared in the same way as the test-substance samples described above but without the peptide. Instead the respective peptide buffer was used. The samples were analyzed together with the calibration samples. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period.

3.7.5. Measurement of peptide concentrations

The analyses of the samples were performed via HPLC under the following conditions:

Table 2: HPLC conditions used for analysis of DPRA samples.

Column:	ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 µm with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)														
Eluent:	A: H ₂ O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V B: ACN/H ₂ O/TFA 950/50/0.85 V/V/V														
Flow:	0.50 mL/min														
Gradient:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>time [min]</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>8.1</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.1</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	time [min]	%B	0	5	8	20	8.1	90	10	90	10.1	5	16	5
time [min]	%B														
0	5														
8	20														
8.1	90														
10	90														
10.1	5														
16	5														
Wavelength:	220 nm and 258 nm														
Injection volume:	2 µL														
Software:	Dionex Chromeleon														

3.8. DATA EVALUATION

Table(s) and/or figure(s) of measured parameters presented in the report were produced using PC based tabular calculation software. The mean and individual data were not always rounded but the significant digits were produced by changing the display format. As a consequence, calculation of mean values using the individual data presented in the report will, in some instances, yield minor variations in value.

The integrated peak areas were transferred electronically into EXCEL data spreadsheets to carry out the necessary calculations.

Some test substances or reaction products may co-eluate with the peptides. In these cases where proper integration and calculation of peptide depletion was not possible, the result for the respective peptide is reported as interference.

When samples were additionally analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm, the area ratio 220 nm/ 258 nm may be calculated and serve as a measure of peak purity. The ratio of a pure peptide peak should be consistent over all samples (100% \pm 10% of the mean of the vehicle controls). However, due to small peak areas calculation of the area ratio may not be possible for all samples.

3.8.1. Calculation of the peptide concentrations

For each peptide a calibration curve was generated from the measured peak areas of the calibration samples of known peptide concentration.

The peptide concentration of the samples was calculated with the respective calibration curve using linear regression (b = axis intercept; m = slope).

$$\text{Peptide concentration [mM]} = \frac{\text{peak area [mAU} \times s] - b}{m}$$

3.8.2. Calculation of the peptide depletion

The peptide depletion of a sample was calculated as follows:

$$\text{Peptide depletion of sample} = \left[1 - \frac{\text{peptide concentration of sample (mM)}}{\text{mean peptide concentration of NC (mM)}} \right] \times 100 \quad [\%]$$

The mean peptide depletion for each of the two peptides was calculated as the mean value of the three samples conducted for each peptide and test substance (C-containing and K-containing peptide depletion; example calculation for C-containing peptide):

$$\text{C - containing peptide depletion of a test substance [\%]} = \text{mean [C - containing peptide depletion of samples 1 - 3] [\%]}$$

When a negative value for C- or K-peptide depletion was obtained the value was considered zero for calculation of the mean peptide depletion.

The mean peptide depletion of a test substance was calculated as the mean value of C-containing peptide depletion and K-containing peptide depletion:

$$\text{Mean peptide depletion [\%]} = \frac{\text{C-containing peptide depletion [\%]} + \text{K-containing peptide depletion [\%]}}{2}$$

3.9. ACCEPTANCE CRITERIA

If any of the acceptance criteria mentioned below is not met, repetition of the test is considered. In the case of an unambiguous result the study director may decide that an experiment is valid despite a deviation of acceptance criteria. However, reasonable justification must then be given.

The standard calibration curve should have an $r^2 > 0.99$.

The negative control (vehicle control) samples of sets A and C should be 0.50 mM +/- 0.05 mM.

The CV of the nine vehicle controls B and C should be < 15%.

Since the mean peptide depletion for each peptide is determined from the mean of three single samples, the variability between these samples should be acceptably low (SD <14.9% for % cysteine depletion and <11.6% for % lysine depletion).

In addition, the positive control should cause depletion of both peptides comparable to historic data.

3.10. EVALUATION OF RESULTS

3.10.1. Peptide depletion

Chemical reactivity was determined by mean peptide depletion [%] and was rated as high, moderate, low, or minimal:

Table 3: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model.

Mean peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 42.47	high reactivity	positive
> 22.62 ≤ 42.47	moderate reactivity	positive
> 8.11 ≤ 22.62	low reactivity	positive
> 4.65 ≤ 8.11	no to low reactivity	borderline ¹
≤ 4.65	minimal or no reactivity	negative

In the case mean peptide depletion [%] cannot be determined due to invalid K-peptide depletion (e.g. insolubility of the K-peptide samples or interference in the samples of the K-peptide) but valid C-peptide depletion is available, evaluation is performed as follows:

Table 4: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 prediction model.

C peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 98.24	high reactivity	positive
> 23.09 ≤ 98.24	moderate reactivity	positive
> 17.28 ≤ 23.09	low reactivity	positive
> 10.50 ≤ 17.28	no to low reactivity	borderline ²
≤ 10.50	minimal or no reactivity	negative

¹ The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 6.38 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 6.38 ≤ 22.62 as “positive” (low reactivity).

² The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 13.89 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 13.89 ≤ 23.09 as “positive” (low reactivity).

3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure

For test substances that are not completely soluble by visual observation in the sample preparations containing the peptides immediately after preparation or after 24 hours, or when a gravimetric procedure is applied (with the exception of application of the undiluted test substance), the result may be under-predictive due to limited availability of the test substance. In this case mean peptide reactivity < 8.11% (Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model) or < 17.28% (Cysteine 1:10 prediction model) is interpreted as “inconclusive”. However, a mean peptide depletion > 8.11% or > 17.28% is considered as “positive”.

3.11. HISTORIC CONTROL DATA

Historic control values of negative and positive controls, gathered over an appropriate time period, are presented in section 4.6. These data demonstrate the reproducibility of results and robustness of the procedures. They are used to derive suitable acceptance criteria (see section 3.9) for the test system.

4. RESULTS

For sample chromatograms of the vehicle control, co-elution control and test-substance samples see Appendix.

4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE

4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
C: Calib. 1	0.534	688.9	17.5	39.3		
C: Calib. 2	0.267	356.4	8.7	41.1	Slope:	1292.5
C: Calib. 3	0.134	186.9	4.5	41.9	Axis intercept:	4.353
C: Calib. 4	0.067	90.6	n.a.	-	Correlation:	0.99970
C: Calib. 5	0.033	44.9	n.a.	-		
C: Calib. 6	0.017	21.6	n.a.	-		
C: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

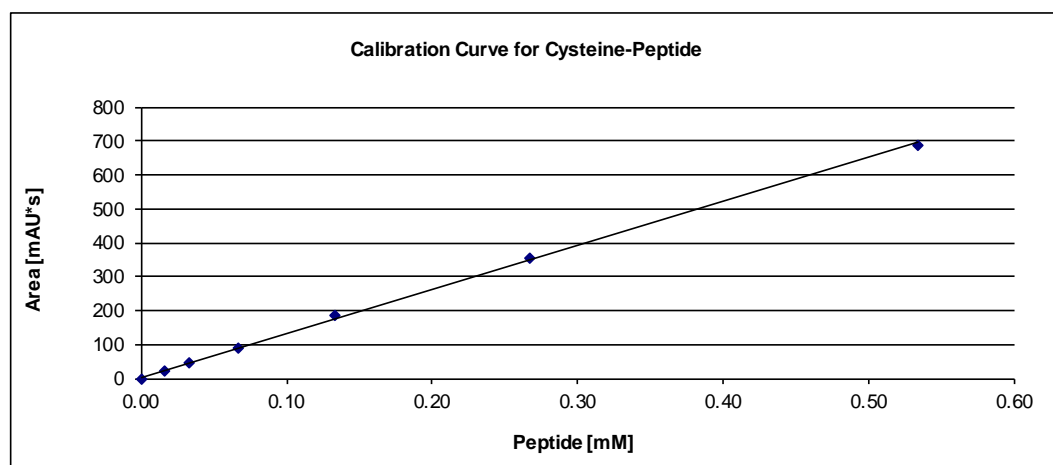


Figure 1: Calibration curve for Cysteine peptide

4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.501 mM with a SD of 0.002 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.497 mM with a SD of 0.005 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.494 mM with a SD of 0.006 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.9%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.1.3.

4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

Table 5: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	650.3	645.1	646.3	0.500	0.496	0.497	0.497	0.002
Neopentylglykol-DGE	204.6	186.2	172.3	0.155	0.141	0.130	0.142	0.013
PC: EGDMA in ACN	352.9	337.9	322.9	0.270	0.258	0.246	0.258	0.012

Reaction with cysteine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	-0.48	0.34	0.14	0.00	0.43
Neopentylglykol-DGE	68.86	71.72	73.88	71.48	2.52
PC: EGDMA in ACN	45.79	48.12	50.45	48.12	2.33

Table 6: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	16.4	16.3	16.4	39.7	39.5	39.5
Neopentylglykol-DGE	5.2	4.7	4.2	39.0	39.9	40.8
PC: EGDMA in ACN	9.0	8.6	8.2	39.3	39.3	39.5

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 39.4. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 99.0% to 103.6% of the mean of the vehicle controls.

4.2. LYSINE-CONTAINING PEPTIDE

4.2.1. Lysine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
K: Calib. 1	0.534	556.1	14.3	39.0		
K: Calib. 2	0.267	285.9	7.3	39.2	Slope:	1040.6
K: Calib. 3	0.134	146.9	n.a.	-	Axis intercept:	3.598
K: Calib. 4	0.067	71.8	n.a.	-	Correlation:	0.99987
K: Calib. 5	0.033	38.3	n.a.	-		
K: Calib. 6	0.017	20.1	n.a.	-		
K: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

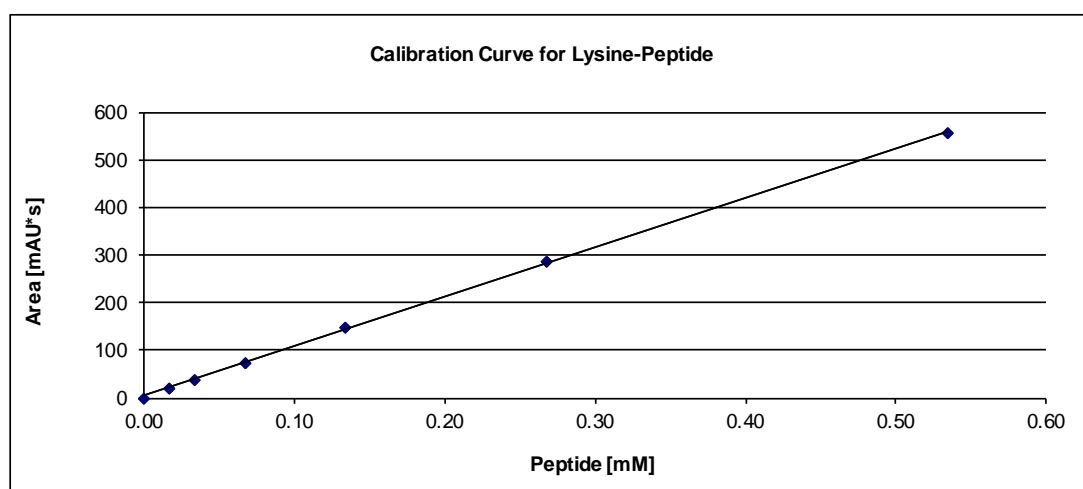


Figure 2: Calibration curve for Lysine peptide

4.2.2. Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.521 mM with a SD of 0.004 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.503 mM with a SD of 0.004 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.504 mM with a SD of 0.003 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 1.1%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.2.3.

4.2.3. Reaction with lysine-peptide

Table 7: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	527.6	542.2	527.9	0.504	0.518	0.504	0.508	0.008
Neopentylglykol-DGE	466.8	470.2	467.2	0.445	0.448	0.446	0.446	0.002
PC: EGDMA in ACN	471.6	470.4	471.7	0.450	0.449	0.450	0.449	0.001

Reaction with lysine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	0.94	-1.82	0.88	0.00	1.58
Neopentylglykol-DGE	12.44	11.80	12.36	12.20	0.35
PC: EGDMA in ACN	11.53	11.77	11.51	11.60	0.14

Table 8: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	12.7	12.5	12.8	41.7	43.3	41.1
Neopentylglykol-DGE	12.2	12.6	12.7	38.2	37.2	36.7
PC: EGDMA in ACN	11.9	11.9	11.9	39.6	39.4	39.5

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 40.4. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 90.9% to 94.4% of the mean of the vehicle controls.

4.3. SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were solutions. Visual observation after the 24-hour incubation time did not reveal precipitates in any samples of the test substance with the peptides.

4.4. CO-ELUTION

No co-elution of the test substance and peptides occurred as demonstrated by the consistent values of the area ratios 220 nm/258 nm (for values see sections 4.1.3 and 4.2.3) and chromatograms of the co-elution control in the Appendix.

4.5. MEAN PEPTIDE DEPLETION

The mean peptide depletion as average of cysteine- and lysine-peptide depletions is calculated and summarized in the table below.

Table 9: Mean peptide depletions of Cysteine, Lysine and both peptides.

	Cysteine-Peptide		Lysine-Peptide		mean of both depletions [%]
	mean depletion [%]	SD [%]	mean depletion [%]	SD [%]	
Neopentylglykol-DGE	71.48	2.52	12.20	0.35	41.84
PC: EGDMA in ACN	48.12	2.33	11.60	0.14	29.86

4.6. HISTORIC CONTROL DATA

The acceptance criteria mentioned in section 3.9 were met.

The positive control caused depletion of both peptides is comparable to historic data as can be seen in the following tables:

Table 10: Historic control data of negative control / vehicle control.

Acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	K-peptide concentration [mM]
Min	0.447	0.451
Max	0.542	0.541
Mean	0.484	0.503
SD	0.017	0.014
n	49	51

Table 11: Historic control data of positive control.

EGDMA, 50 mM in acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	C-peptide depletion [%]	K-peptide concentration [mM]	K-peptide depletion [%]
Min	0.058	43.32	0.373	7.99
Max	0.282	88.30	0.489	25.24
Mean	0.211	56.36	0.429	15.27
SD	0.040	8.09	0.024	3.23
n		31		31

5. CONCLUSION

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **Neopentylglykol-DGE, CAS No.: 17557-23-2, shows a moderate chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

6. VALIDITY CRITERIA / REFERENCES

Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Eltze 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(3):489-504.

Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittenvin JP. (2007) Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicological Sciences* 97(2), 417-427.

OECD 2012: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins (2012) OECD ENVIRONMENT, HEALTH AND SAFETY PUBLICATIONS: No.168; ENV/JM/MONO(2012)10
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en) last accessed 05 Feb 2013.

OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle SN, Landsiedel R, Jaworska J, Kern P, 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. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71(2), 135-352.

7. LIST OF ABBREVIATIONS

The following list contains abbreviations and definitions generally used in reports for this study type. This report will not necessarily use all expressions listed below.

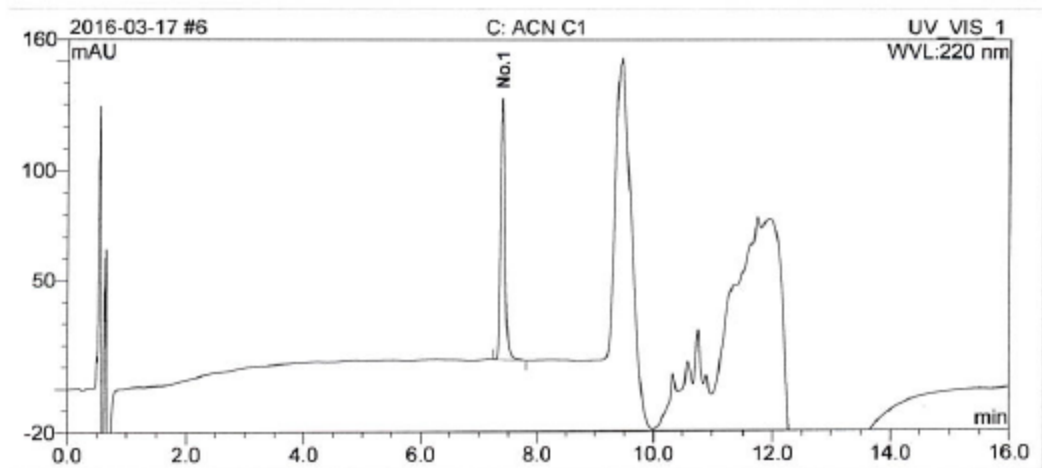
A	= alanine
AC	= acetone
Ac	= acetyl group
ACN	= acetonitrile
approx..	= approximately
C	= cysteine
ca.	= circa
Calib.	= calibration sample
cm	= centimeter
cm ²	= square centimeter
COOH	= carboxyl group
CV	= coefficient of variation
d	= day
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DTT	= dithiothreitol
EGDMA	= ethylene glycol dimethacrylate
F	= phenylalanine
G; g	= gram
h	= hour
IPA	= isopropyl alcohol (isopropanol)
K	= lysine
M	= mol / liter
mAU	= milli absorbance units
MeOH	= methanol
mg	= milligram
µg	= microgram
Min, min	= minute(s)
µL	= microliter
mL	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimol / liter
µm	= micrometer
MW	= Molecular weight

n.a.	= not assigned
NC	= negative control
No.; no.	= number
nm	= nanometer
p.a.	= per analysis
PC	= positive control
PrOH	= propanol
R	= arginine
SD	= standard deviation
SK	= co-elution control (Substanzkontrolle)
STD	= standard
TFA	= trifluoroacetic acid
UV	= ultraviolet
v/v	= volume / volume
Symbols:	
°C	= degree Celsius
~	= circa
=	= analogous
%	= per cent
∅	= diameter

APPENDIX

SAMPLE CHROMATOGRAMS

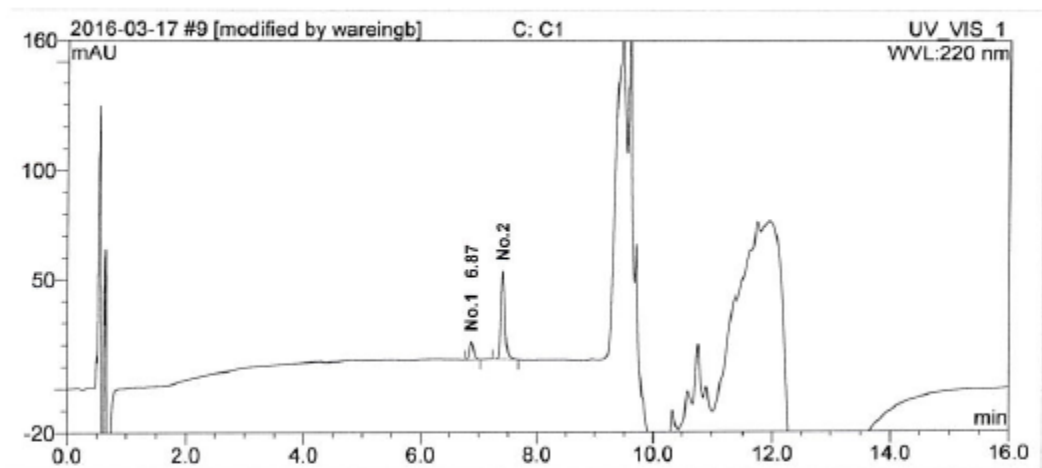
Sample Name:	C: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	17/03/16 12:20
Vial Number:	RA5	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	7.3875	650.306	119.438		100.0

Figure 3: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the C-containing peptide

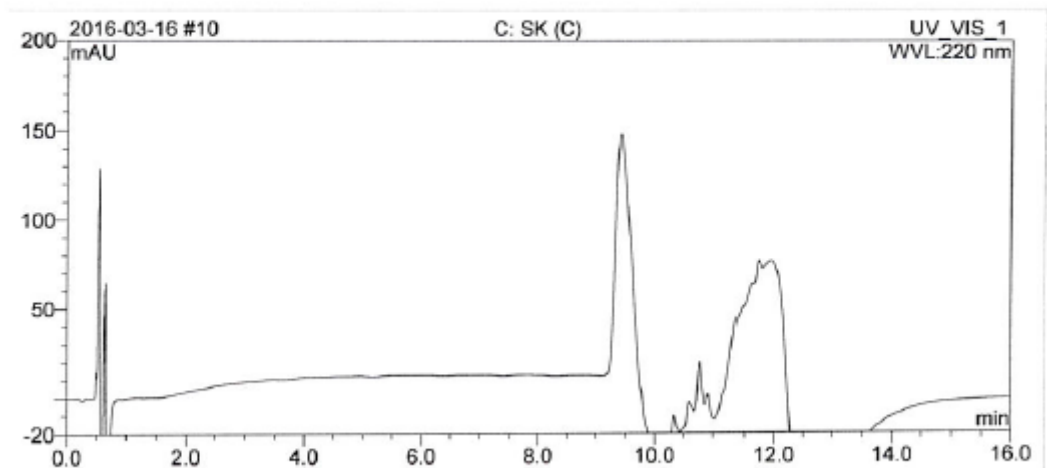
Sample Name:	C: C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	17/03/16 13:11
Vial Number:	RA8	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	6.8725	38.995	8.321		16.0
2	7.4058	204.560	40.538	243.555	84.0

Figure 4: Test substance incubated with the C-containing peptide

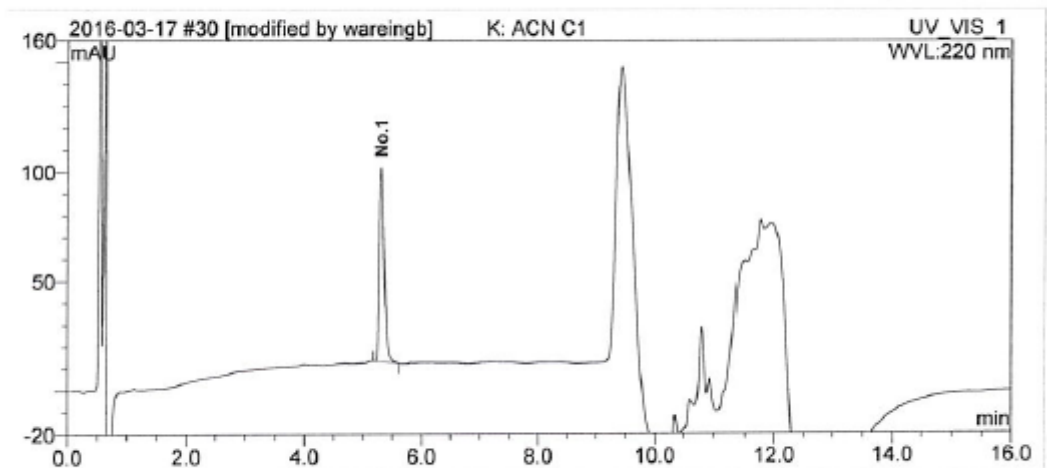
Sample Name:	C: SK (C)		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	16/03/16 14:42
Vial Number:	RB1	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
-----	--------------	------------	------------	----------------	------------

Figure 5: Co-elution control (sample in pH 7.5 phosphate buffer)

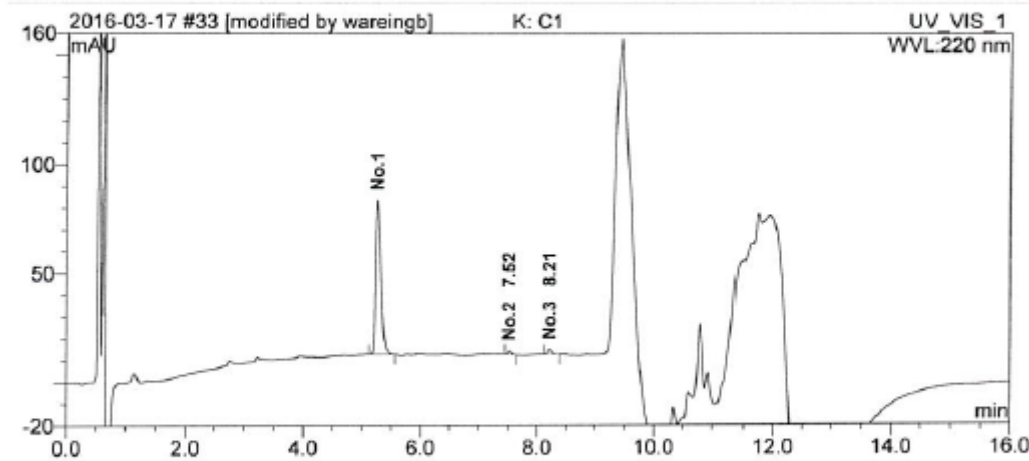
Sample Name:	K: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	17/03/16 19:05
Vial Number:	RD5	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.3050	527.602	89.001		100.0

Figure 6: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the K-containing peptide

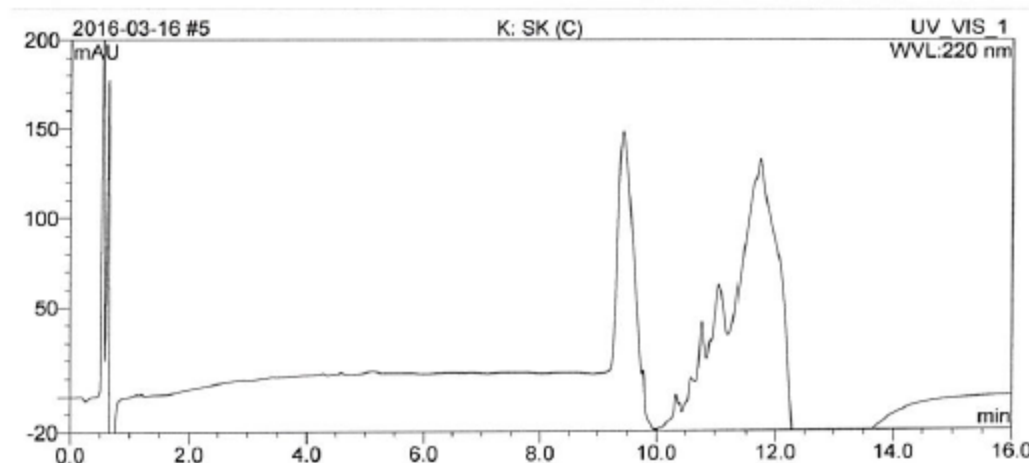
Sample Name:	K: C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	17/03/16 19:56
Vial Number:	RD8	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.2592	466.796	70.766		96.3
2	7.5225	7.483	1.682		1.5
3	8.2117	10.562	2.147	484.840	2.2

Figure 7: Test substance incubated with the K-containing peptide

Sample Name:	K: SK (C)		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	16/03/16 13:18
Vial Number:	RA4	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
-----	--------------	------------	------------	----------------	------------

Figure 8: Co-elution control (sample in pH 10.2 ammonium acetate buffer)

ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE

Certificate of Analysis

15/0578-1 *
* added 06.01.16 dli

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Neopentyl glycol diglycidyl ether – technical grade

Product Number: 338036
Batch Number: MKBR3896V
Brand: ALDRICH
CAS Number: 17557-23-2
MDL Number: MFCD00040687
Formula: C₁₁H₂₀O₄
Formula Weight: 216.27 g/mol
Quality Release Date: 10 MAR 2014



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Miscellaneous Assay	135 - 165	144
Epoxide Equivalent, g/eq		
Viscosity	10 - 30	17
mPa.s (25C)		



Jamie Gleason, Manager
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin US

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

STUDY TITLE

Report

**1,6-Hexandiol-DGE (s0347)
CAS No.: 16096-31-4**In Vitro Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay
(DPRA Test)**TEST GUIDELINE(S)**

OECD 442C

AUTHOR(S)

B. Wareing B.Sc. (Study Director)

STUDY COMPLETION DATE

24 May 2016

TEST FACILITY

BASF SE

Experimental Toxicology and Ecology
67056 Ludwigshafen, Germany**TEST FACILITY PROJECT IDENTIFICATION**

Project No.: 64V0689/05A052

SPONSORForschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Klarastraße 63
79106 Freiburg, Germany

This document contains manufacturing and trade secrets of the Sponsor(s). It is the property of the Sponsor(s) and may be used only for that purpose for which it was intended by the Sponsor(s). Every other or additional use, exploitation, reproduction, publication or submission to other parties require the written permission of the Sponsor(s), with the exception of regulatory agencies acting within the limits of their administrative authority.

SIGNATURE PAGE

Study Director:

B. Wareing 24 May 2016

B. Wareing B.Sc.

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

Head of Experimental Toxicology and Ecology:

Prof. Dr. rer. nat. B. v. Ravenzwaay

Test Facility Management:

Dr. rer. nat. R. Landsiedel

Study director:

B. Wareing B.Sc.

Applied Alternative Methods:

B. Wareing B.Sc.

CONTENTS

TITLE PAGE

SIGNATURE PAGE

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

CONTENTS

1. SUMMARY
2. INTRODUCTION
 - 2.1. OBJECTIVES
 - 2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS
 - 2.3. TEST GUIDELINES
 - 2.4. TIME SCHEDULE
3. MATERIALS AND METHODS
 - 3.1. TEST ITEM
 - 3.2. TEST SYSTEM
 - 3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT
 - 3.4. CONTROLS
 - 3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION
 - 3.6. ANALYSES
 - 3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE
 - 3.7.1. Test substance solubility
 - 3.7.2. Preparation of peptide stock solutions
 - 3.7.2.1. Preparation of calibration samples
 - 3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples
 - 3.7.3. Preparation of the vehicle controls
 - 3.7.4. Preparation of the co-elution control
 - 3.7.5. Measurement of peptide concentrations
 - 3.8. DATA EVALUATION
 - 3.8.1. Calculation of the peptide concentrations
 - 3.8.2. Calculation of the peptide depletion
 - 3.9. ACCEPTANCE CRITERIA
 - 3.10. EVALUATION OF RESULTS
 - 3.10.1. Peptide depletion
 - 3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure
 - 3.11. HISTORIC CONTROL DATA
4. RESULTS
 - 4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE
 - 4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve
 - 4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile
 - 4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

4.2.	LYSINE-CONTAINING PEPTIDE
4.2.1.	Lysine-peptide calibration curve
4.2.2.	Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile
4.2.3.	Reaction with lysine-peptide
4.3.	SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES
4.4.	CO-ELUTION
4.5.	MEAN PEPTIDE DEPLETION
4.6.	HISTORIC CONTROL DATA
5.	CONCLUSION
6.	VALIDITY CRITERIA / REFERENCES
7.	LIST OF ABBREVIATIONS
APPENDIX	
SAMPLE CHROMATOGRAMS	
ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE	
Certificate of Analysis	

1. SUMMARY

The reactivity of **1,6-Hexandiol-DGE (s0347)**, CAS No.: **16096-31-4**, towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides was evaluated in the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). For this purpose the test substance was incubated with synthetic peptides for ca. 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The test substance was dissolved at a 100 mM concentration in acetonitrile. Three samples of the test substance were incubated with each peptide in ratios of 1:10 (for C-peptide) or 1:50 (for K-peptide). Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides.

Further, a co-elution control was assessed in order to detect possible interference of the test substance with the peptides. The samples consisted of the test substance, vehicle and the respective peptide buffer but without peptide. Moreover the samples were analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm and the area ratio 220 nm/ 258 nm was calculated as a measure of peak purity.

The following results were obtained in the DPRA:

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were solutions. Visual observation after the 24-hour incubation time did not reveal precipitates in any samples of the test substance with the peptides.

No co-elution of test substance and peptides was noticed.

The mean C-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 83.89%. The mean K-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 15.94%.

Thus, the mean peptide depletion was calculated to be 49.92%.

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **1,6-Hexandiol-DGE (s0347)**, CAS No.: **16096-31-4**, shows a high chemical reactivity in the DPRA under the test conditions chosen.

2. INTRODUCTION

2.1. OBJECTIVES

Chemical reactivity has been shown to be well associated with allergenic potency (Gerberick et al., 2007) and has been described as the molecular initiating event in the OECD adverse outcome pathway (OECD Publication No.168; ENV/JM/MONO(2012)10). Within this context measuring the amount of proteins with nucleophilic side chains such as cysteine or lysine residues after incubation with putative allergens serves as surrogate markers.

In the DPRA the reactivity of a test item (=test substance) towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides is evaluated. For this purpose the test substance is incubated with synthetic peptides for 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentration is determined thereafter by high performance liquid chromatography with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The peptide depletion of test-substance incubated samples is compared to the peptide depletion of the NC samples and expressed as relative peptide depletion.

Due to the complexity of the skin sensitization process a single in vitro assay is not sufficient to adequately assess this toxicological endpoint. Therefore, a combination of several methods addressing two major steps of the sensitization process: protein reactivity and activation of dendritic cells has been proposed in a strategy to assess the sensitizing potential (Bauch et al. 2012, Urbisch et al. 2015).

2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

2.3. TEST GUIDELINES

The study was conducted based on the following test guideline:

- OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

2.4. TIME SCHEDULE

Test dates:	Experimental starting date (1 st weighing of test substance for sample preparation)	19 Apr 2016
	Sample preparation (C- and K-peptide)	19 Apr 2016
	Experimental completion date (documentation of check of raw data)	18 May 2016

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. TEST ITEM

The test item (= test substance) was used with the given specifications of the producer (Brial Allergen GmbH). No further analyses were conducted.

Name of test substance:	1,6-Hexandiol-DGE (s0347)
Test-substance No.:	05/0689-2
Batch identification:	801 150
CAS No.:	16096-31-4
Purity:	>95 % (information provided by the sponsor; 95% was used for calculation of 100 mM preparation).
Identity:	Confirmed (see Certificate of Analysis in the Appendix)
Homogeneity:	The test substance was homogeneous by visual inspection.
Date of expiry:	Nov 2017

ADDITIONAL TEST-SUBSTANCE INFORMATION

Physical state / color:	Liquid / clear, slight yellow to yellow
Molecular weight:	230.30 g/mol
Log K _{ow} :	0.822 (taken from MSDS)
Proposed reaction mechanism for protein binding by OECD toolbox:	The OECD toolbox proposed the following reaction mechanism for protein binding for either the substance or its predicted metabolites (auto-oxidation, hydrolysis, and skin metabolism): nucleophilic substitution

3.2. TEST SYSTEM

Synthetic peptides:	Cysteine- (C-) containing peptide: Ac-RFAACAA-COOH (MW=751.9 g/mol) Lysine- (K-) containing peptide: Ac-RFAAKAA-COOH (MW=776.2 g/mol) The peptides are custom material (Supplier: GenScript, Picataway, NJ, USA and/or RS Synthesis, Louisville KY, USA) containing phenylalanine to aid in detection and either cysteine or lysine as the reactive center.
---------------------	---

3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT

HPLC:	Liquid chromatograph Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000 consisting of the following modules: Pump: HPG-3400RS Autosampler: WPS-3000TSL Column oven: TCC-3000 UV-Detector: DAD-3000
Column:	ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 µm with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)
HPLC mobile phase A:	H ₂ O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V
HPLC mobile phase B:	ACN/H ₂ O/TFA 950/50/0.85 V/V/V
Incubator:	Midi 40 Incubator (Thermo Scientific)
pH meter:	Readability +/- 0.1 pH units. For adjusting pH-values of buffers.
Reagents for preparing the buffers:	for pH 7.5 phosphate buffer (used for solving C-containing peptide): Sodium phosphate, monobasic monohydrate, CAS no. 10049-21-5 (e.g. Sigma-Aldrich S9638) Sodium phosphate, dibasic heptahydrate, CAS no. 7782-85-6 (e.g. Sigma-Aldrich S9390) for pH 10.2 ammonium acetate buffer (used for solving K-containing peptide): Ammonium acetate, CAS no. 631-61-8 (e.g. Sigma-Aldrich 32301) Ammonium hydroxide, 28% – 30%, CAS no. 1336-21-6 (e.g. Sigma-Aldrich 320145)

3.4. CONTROLS

Negative control (NC):	vehicle control = acetonitrile
Positive control (PC):	Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA; CAS-no. 97-90-5), prepared as a 50 mM solution in acetonitrile.
Co-elution control:	Sample prepared of the respective peptide buffer and the test substance but without peptide.

3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION

The test substance solution was prepared on a weight per volume basis within 4 hours of performing the assay (preparation of samples).

Test-substance preparation: The test substance was prepared as a 100 mM solution in acetonitrile. After short stirring the test substance was soluble in the vehicle.

Vehicle: acetonitrile

Reason for the vehicle: The test substance was soluble in acetonitrile.

3.6. ANALYSES

Because the test-substance preparation was incubated with the peptide shortly after preparation, no analysis of the test substance in the vehicle was performed.

3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE

The test substance was dissolved in a suitable vehicle. Three samples of the test substance were incubated with each peptide. Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides. The remaining non-depleted peptide concentration was determined thereafter by HPLC with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

In addition calibration samples of known peptide concentration, prepared from the respective peptide stock solution used for test-substance incubation, were measured in parallel with the same analytical method.

3.7.1. Test substance solubility

Prior to the assay the solubility of the test substance was tested. A suitable non-reactive, water-miscible solvent which dissolves the test substance completely (no visible precipitation or cloudiness of the test-substance preparation) should be used. The preferred solvent was acetonitrile. When not soluble in acetonitrile solutions in water, isopropanol, acetone, propanol, methanol or mixtures of these solvents were tried.

3.7.2. Preparation of peptide stock solutions

Peptide stock solutions in a concentration of 0.667 mM were prepared in pH 7.5 phosphate buffer (C-containing peptide) or pH 10.2 ammonium acetate buffer (K-containing peptide). The peptide stock solution was used for preparing the calibration samples and the test-substance and control samples.

3.7.2.1. Preparation of calibration samples

The following calibration samples were prepared from the peptide stock solutions in 20% acetonitrile:buffer (= dilution buffer) using serial dilution:

Table 1: Calibration samples of DPRA.

	Calib. 1	Calib. 2	Calib. 3	Calib. 4	Calib. 5	Calib. 6	Dilution buffer
mM peptide	0.534	0.267	0.134	0.067	0.033	0.017	0.000

The analysis of the calibration samples was started before analysis of the test-substance samples.

3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples

The samples were prepared in triplicates for each peptide.

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

The samples were prepared in suitable tubes, capped tightly and incubated at $25^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ in the dark for 24 +/- 2 hours. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period. The HPLC analysis of the batch of samples started about 24 hours after sample preparation and the analysis time itself did not exceed 30 hours.

3.7.3. Preparation of the vehicle controls

Several acetonitrile controls were prepared in triplicates in the same way as the test-substance samples described above but with acetonitrile instead of the test substance: One set (set A) was analyzed together with the calibration samples without incubation and serves as a performance control. Another three sets (two sets B and set C) were prepared and incubated with the samples. Sets B were placed at the very start and ending of the sample list and serve as stability control of the peptide over the analysis time. Set C was analyzed with the samples and serves for calculation of the peptide depletion of any chemical formulated in acetonitrile.

3.7.4. Preparation of the co-elution control

The co-elution control was prepared in the same way as the test-substance samples described above but without the peptide. Instead the respective peptide buffer was used. The samples were analyzed together with the calibration samples. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period.

3.7.5. Measurement of peptide concentrations

The analyses of the samples were performed via HPLC under the following conditions:

Table 2: HPLC conditions used for analysis of DPRA samples.

Column:	ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 µm with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)														
Eluent:	A: H2O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V B: ACN/H2O/TFA 950/50/0.85 V/V/V														
Flow:	0.50 mL/min														
Gradient:	<table><thead><tr><th>time [min]</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>5</td></tr><tr><td>8</td><td>20</td></tr><tr><td>8.1</td><td>90</td></tr><tr><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>10.1</td><td>5</td></tr><tr><td>16</td><td>5</td></tr></tbody></table>	time [min]	%B	0	5	8	20	8.1	90	10	90	10.1	5	16	5
time [min]	%B														
0	5														
8	20														
8.1	90														
10	90														
10.1	5														
16	5														
Wavelength:	220 nm and 258 nm														
Injection volume:	2 µL														
Software:	Dionex Chromeleon														

3.8. DATA EVALUATION

Table(s) and/or figure(s) of measured parameters presented in the report were produced using PC based tabular calculation software. The mean and individual data were not always rounded but the significant digits were produced by changing the display format. As a consequence, calculation of mean values using the individual data presented in the report will, in some instances, yield minor variations in value.

The integrated peak areas were transferred electronically into EXCEL data spreadsheets to carry out the necessary calculations.

Some test substances or reaction products may co-eluate with the peptides. In these cases where proper integration and calculation of peptide depletion was not possible, the result for the respective peptide is reported as interference.

When samples were additionally analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm, the area ratio 220 nm/ 258 nm may be calculated and serve as a measure of peak purity. The ratio of a pure peptide peak should be consistent over all samples (100% ± 10% of the mean of the vehicle controls). However, due to small peak areas calculation of the area ratio may not be possible for all samples.

3.8.1. Calculation of the peptide concentrations

For each peptide a calibration curve was generated from the measured peak areas of the calibration samples of known peptide concentration.

The peptide concentration of the samples was calculated with the respective calibration curve using linear regression (b = axis intercept; m = slope).

$$\text{Peptide concentration [mM]} = \frac{\text{peak area [mAU} \times \text{s]} - b}{m}$$

3.8.2. Calculation of the peptide depletion

The peptide depletion of a sample was calculated as follows:

$$\text{Peptide depletion of sample} = \left[1 - \frac{\text{peptide concentration of sample (mM)}}{\text{mean peptide concentration of NC (mM)}} \right] \times 100 \quad [\%]$$

The mean peptide depletion for each of the two peptides was calculated as the mean value of the three samples conducted for each peptide and test substance (C-containing and K-containing peptide depletion; example calculation for C-containing peptide):

$$\text{C - containing peptide depletion of a test substance [\%]} = \text{mean}[\text{C - containing peptide depletion of samples 1 - 3}][\%]$$

When a negative value for C- or K-peptide depletion was obtained the value was considered zero for calculation of the mean peptide depletion.

The mean peptide depletion of a test substance was calculated as the mean value of C-containing peptide depletion and K-containing peptide depletion:

$$\text{Mean peptide depletion [\%]} = \frac{\text{C - containing peptide depletion [\%]} + \text{K - containing peptide depletion [\%]}}{2}$$

3.9. ACCEPTANCE CRITERIA

If any of the acceptance criteria mentioned below is not met, repetition of the test is considered. In the case of an unambiguous result the study director may decide that an experiment is valid despite a deviation of acceptance criteria. However, reasonable justification must then be given.

The standard calibration curve should have an $r^2 > 0.99$.

The negative control (vehicle control) samples of sets A and C should be 0.50 mM +/- 0.05 mM.

The CV of the nine vehicle controls B and C should be < 15%.

Since the mean peptide depletion for each peptide is determined from the mean of three single samples, the variability between these samples should be acceptably low (SD <14.9% for % cysteine depletion and <11.6% for % lysine depletion).

In addition, the positive control should cause depletion of both peptides comparable to historic data.

3.10. EVALUATION OF RESULTS

3.10.1. Peptide depletion

Chemical reactivity was determined by mean peptide depletion [%] and was rated as high, moderate, low, or minimal:

Table 3: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model.

Mean peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 42.47	high reactivity	positive
> 22.62 ≤ 42.47	moderate reactivity	positive
> 8.11 ≤ 22.62	low reactivity	positive
> 4.65 ≤ 8.11	no to low reactivity	borderline ¹
≤ 4.65	minimal or no reactivity	negative

In the case mean peptide depletion [%] cannot be determined due to invalid K-peptide depletion (e.g. insolubility of the K-peptide samples or interference in the samples of the K-peptide) but valid C-peptide depletion is available, evaluation is performed as follows:

¹ The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 6.38 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 6.38 ≤ 22.62 as “positive” (low reactivity).

Table 4: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 prediction model.

C peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 98.24	high reactivity	positive
> 23.09 ≤ 98.24	moderate reactivity	positive
> 17.28 ≤ 23.09	low reactivity	positive
> 10.50 ≤ 17.28	no to low reactivity	borderline ²
≤ 10.50	minimal or no reactivity	negative

3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure

For test substances that are not completely soluble by visual observation in the sample preparations containing the peptides immediately after preparation or after 24 hours, or when a gravimetric procedure is applied (with the exception of application of the undiluted test substance), the result may be under-predictive due to limited availability of the test substance. In this case mean peptide reactivity < 8.11% (Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model) or < 17.28% (Cysteine 1:10 prediction model) is interpreted as “inconclusive”. However, a mean peptide depletion > 8.11% or > 17.28% is considered as “positive”.

3.11. HISTORIC CONTROL DATA

Historic control values of negative and positive controls, gathered over an appropriate time period, are presented in section 4.6. These data demonstrate the reproducibility of results and robustness of the procedures. They are used to derive suitable acceptance criteria (see section 3.9) for the test system.

² The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 13.89 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 13.89 ≤ 23.09 as “positive” (low reactivity).

4. RESULTS

For sample chromatograms of the vehicle control, co-elution control and test-substance samples see Appendix.

4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE

4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
C: Calib. 1	0.534	683.7	17.2	39.7		
C: Calib. 2	0.267	346.2	8.8	39.4	Slope:	1280.3
C: Calib. 3	0.134	173.3	n.a.	-	Axis intercept:	1.682
C: Calib. 4	0.067	88.7	n.a.	-	Correlation:	0.99997
C: Calib. 5	0.033	44.2	n.a.	-		
C: Calib. 6	0.017	21.6	n.a.	-		
C: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

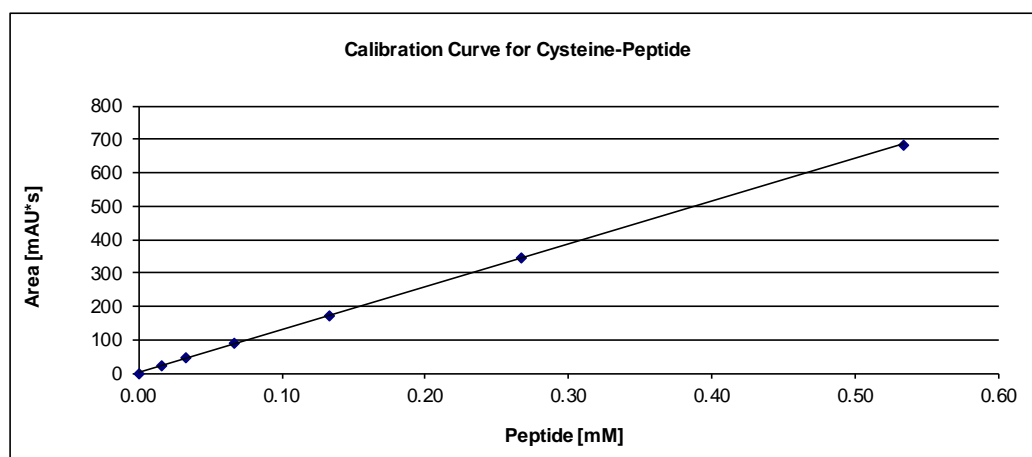


Figure 1: Calibration curve for Cysteine peptide

4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.493 mM with a SD of 0.002 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.492 mM with a SD of 0.001 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.497 mM with a SD of 0.003 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.7%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.1.3.

4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

Table 5: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	627.8	628.9	632.5	0.489	0.490	0.493	0.491	0.002
1,6-Hexandiol-DGE (s0347)	113.1	103.2	92.3	0.087	0.079	0.071	0.079	0.008
PC: EGDMA in ACN	307.4	293.5	281.3	0.239	0.228	0.218	0.228	0.010

Reaction with cysteine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	0.30	0.13	-0.44	0.00	0.39
1,6-Hexandiol-DGE (s0347)	82.26	83.83	85.57	83.89	1.66
PC: EGDMA in ACN	51.32	53.54	55.48	53.45	2.08

Table 6: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	16.0	15.9	15.9	39.2	39.4	39.9
1,6-Hexandiol-DGE (s0347)	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
PC: EGDMA in ACN	7.7	7.2	6.9	39.8	40.5	40.7

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 39.8.

For the test substance calculation of an area ratio 220 nm/ 258 nm was not possible due to small peak values.

4.2. LYSINE-CONTAINING PEPTIDE

4.2.1. Lysine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
K: Calib. 1	0.534	538.9	13.9	38.8		
K: Calib. 2	0.267	274.4	6.9	39.7	Slope:	1014.8
K: Calib. 3	0.134	130.2	n.a.	-	Axis intercept:	-1.538
K: Calib. 4	0.067	64.9	n.a.	-	Correlation:	0.99990
K: Calib. 5	0.033	32.7	n.a.	-		
K: Calib. 6	0.017	15.0	n.a.	-		
K: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

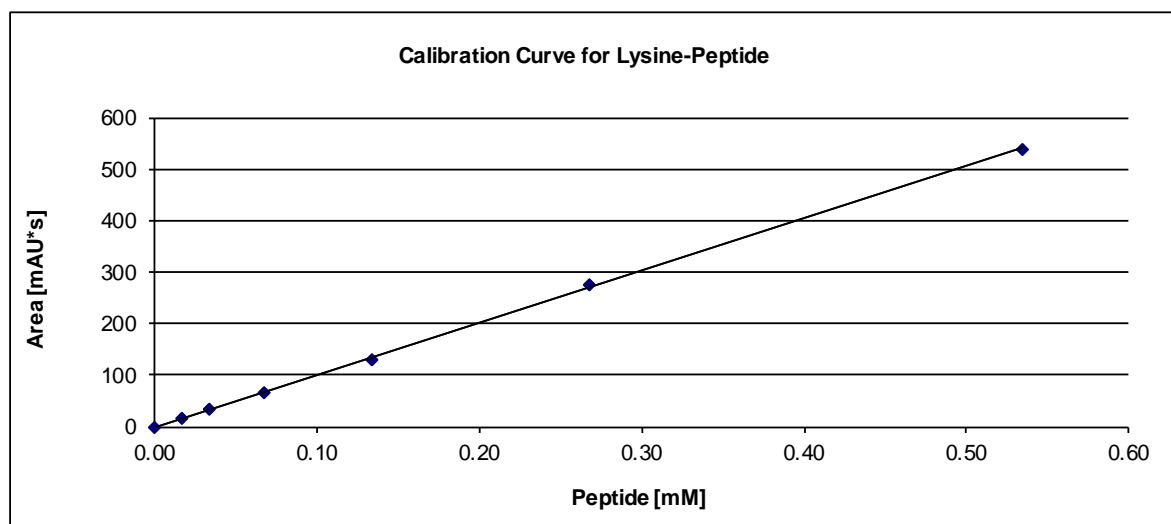


Figure 2: Calibration curve for Lysine peptide

4.2.2. Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.506 mM with a SD of 0.002 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.518 mM with a SD of 0.002 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.525 mM with a SD of 0.005 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.8%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.2.3.

4.2.3. Reaction with lysine-peptide

Table 7: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	524.2	528.0	531.2	0.518	0.522	0.525	0.522	0.003
1,6-Hexandiol-DGE (s0347)	444.7	441.2	444.3	0.440	0.436	0.439	0.438	0.002
PC: EGDMA in ACN	458.6	455.1	453.3	0.453	0.450	0.448	0.451	0.003

Reaction with lysine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	0.68	-0.04	-0.64	0.00	0.66
1,6-Hexandiol-DGE (s0347)	15.71	16.36	15.77	15.94	0.36
PC: EGDMA in ACN	13.08	13.73	14.08	13.63	0.51

Table 8: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	13.2	13.2	13.1	39.6	40.1	40.6
1,6-Hexandiol-DGE (s0347)	11.0	10.9	10.9	40.6	40.3	40.7
PC: EGDMA in ACN	11.7	11.5	11.5	39.1	39.4	39.3

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 40.2. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 100.5% to 101.3% of the mean of the vehicle controls.

4.3. SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were solutions. Visual observation after the 24-hour incubation time did not reveal precipitates in any samples of the test substance with the peptides.

4.4. CO-ELUTION

No co-elution of the test substance and peptides occurred as demonstrated by the consistent values of the area ratios 220 nm/258 nm (available for lysine only due to low area values of the cysteine-peaks; for values see sections 4.1.3 and 4.2.3) and chromatograms of the co-elution control in the Appendix.

4.5. MEAN PEPTIDE DEPLETION

The mean peptide depletion as average of cysteine- and lysine-peptide depletions is calculated and summarized in the table below.

Table 9: Mean peptide depletions of Cysteine, Lysine and both peptides.

	Cysteine-Peptide		Lysine-Peptide		mean of both depletions [%]
	mean depletion [%]	SD [%]	mean depletion [%]	SD [%]	
1,6-Hexandiol-DGE (s0347)	83.89	1.66	15.94	0.36	49.92
PC: EGDMA in ACN	53.45	2.08	13.63	0.51	33.54

4.6. HISTORIC CONTROL DATA

The acceptance criteria mentioned in section 3.9 were met.

The positive control caused depletion of both peptides is comparable to historic data as can be seen in the following table:

Table 10: Historic control data of negative control / vehicle control.

Acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Mar 2016

	C-peptide concentration [mM]	K-peptide concentration [mM]
Min	0.447	0.451
Max	0.542	0.541
Mean	0.485	0.503
SD	0.016	0.014
n	53	55

Table 11: Historic control data of positive control.

EGDMA, 50 mM in acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Mar 2016

	C-peptide concentration [mM]	C-peptide depletion [%]	K-peptide concentration [mM]	K-peptide depletion [%]
Min	0.058	43.32	0.373	7.99
Max	0.282	88.30	0.489	25.24
Mean	0.215	55.61	0.431	14.88
SD	0.040	7.92	0.023	3.21
n		35		35

5. CONCLUSION

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **1,6-Hexandiol-DGE (s0347), CAS No.: 16096-31-4, shows a high chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

6. VALIDITY CRITERIA / REFERENCES

Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Eltze 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(3):489-504.

Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittenvin JP. (2007) Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicological Sciences* 97(2), 417-427.

OECD 2012: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins (2012) OECD ENVIRONMENT, HEALTH AND SAFETY PUBLICATIONS: No.168; ENV/JM/MONO(2012)10
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en) last accessed 05 Feb 2013.

OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle SN, Landsiedel R, Jaworska J, Kern P, 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. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71(2), 135-352.

7. LIST OF ABBREVIATIONS

The following list contains abbreviations and definitions generally used in reports for this study type. This report will not necessarily use all expressions listed below.

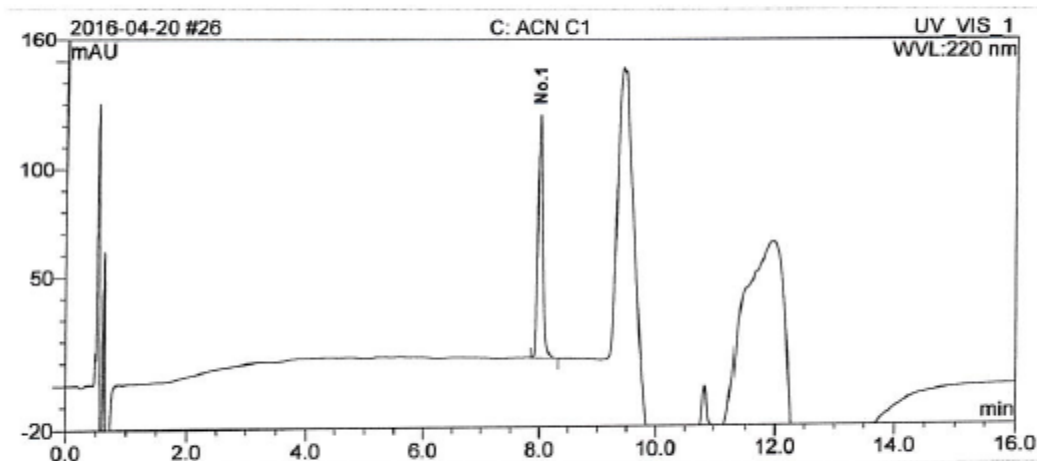
A	= alanine
AC	= acetone
Ac	= acetyl group
ACN	= acetonitrile
approx..	= approximately
C	= cysteine
ca.	= circa
Calib.	= calibration sample
cm	= centimeter
cm ²	= square centimeter
COOH	= carboxyl group
CV	= coefficient of variation
d	= day
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DTT	= dithiothreitol
EGDMA	= ethylene glycol dimethacrylate
F	= phenylalanine
G; g	= gram
h	= hour
IPA	= isopropyl alcohol (isopropanol)
K	= lysine
M	= mol / liter
mAU	= milli absorbance units
MeOH	= methanol
mg	= milligram
µg	= microgram
Min, min	= minute(s)
µL	= microliter
mL	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimol / liter
µm	= micrometer
MW	= Molecular weight

n.a.	= not assigned
NC	= negative control
No.; no.	= number
nm	= nanometer
p.a.	= per analysis
PC	= positive control
PrOH	= propanol
R	= arginine
SD	= standard deviation
SK	= co-elution control (Substanzkontrolle)
STD	= standard
TFA	= trifluoroacetic acid
UV	= ultraviolet
v/v	= volume / volume
Symbols:	
°C	= degree Celsius
~	= circa
=	= analogous
%	= per cent
∅	= diameter

APPENDIX

SAMPLE CHROMATOGRAMS

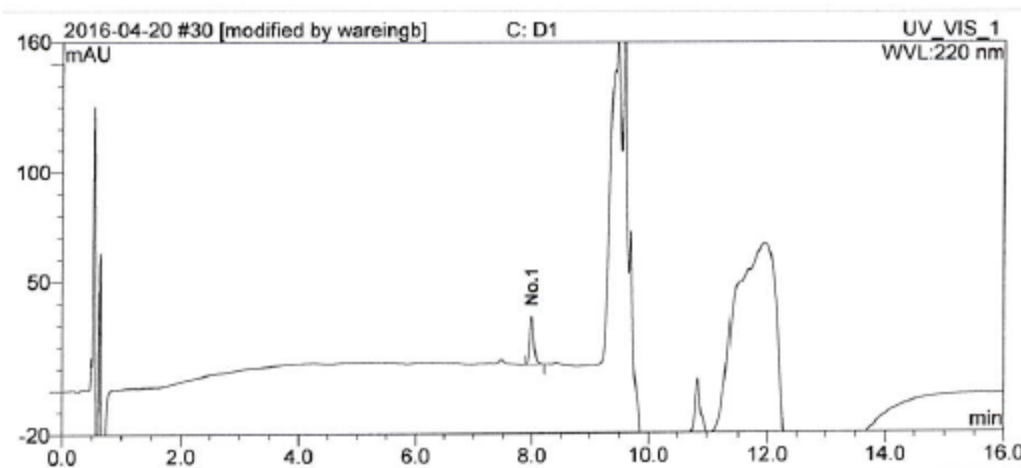
Sample Name:	C: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	GA4	Recording Time:	20/04/16 17:26
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret. Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel. Area %
1	7.9950	627.846	113.393		100.0

Figure 3: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the C-containing peptide

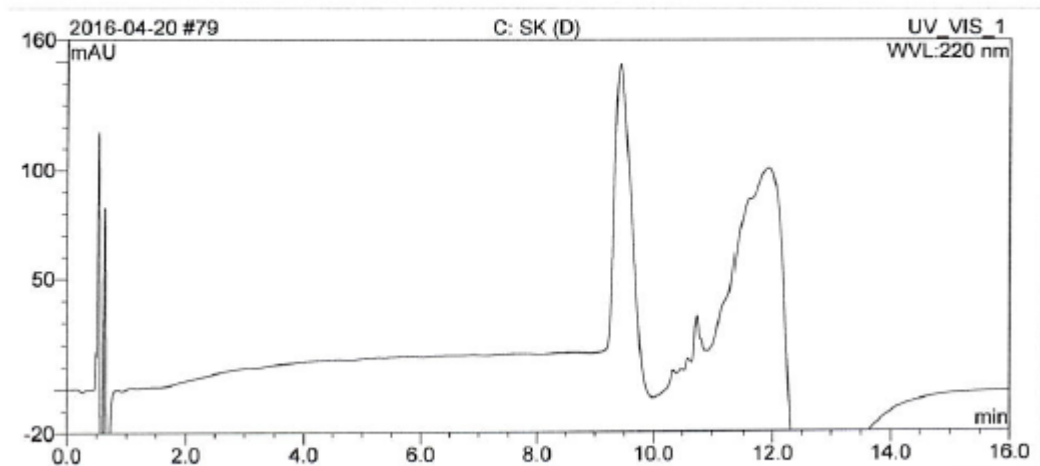
Sample Name:	C: D1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	GAB	Recording Time:	20/04/16 18:33
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret. Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel. Area %
1	7.9942	113.099	22.167		100.0

Figure 4: Test substance incubated with the C-containing peptide

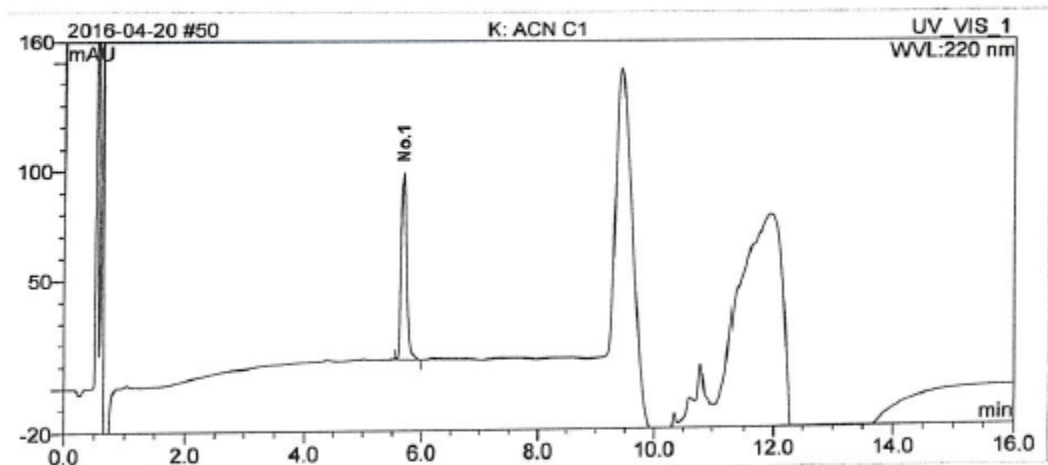
Sample Name:	C: SK (D)		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	21/04/16 08:21
Vial Number:	RB2	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
-----	--------------	------------	------------	----------------	------------

Figure 5: Co-elution control (sample in pH 7.5 phosphate buffer)

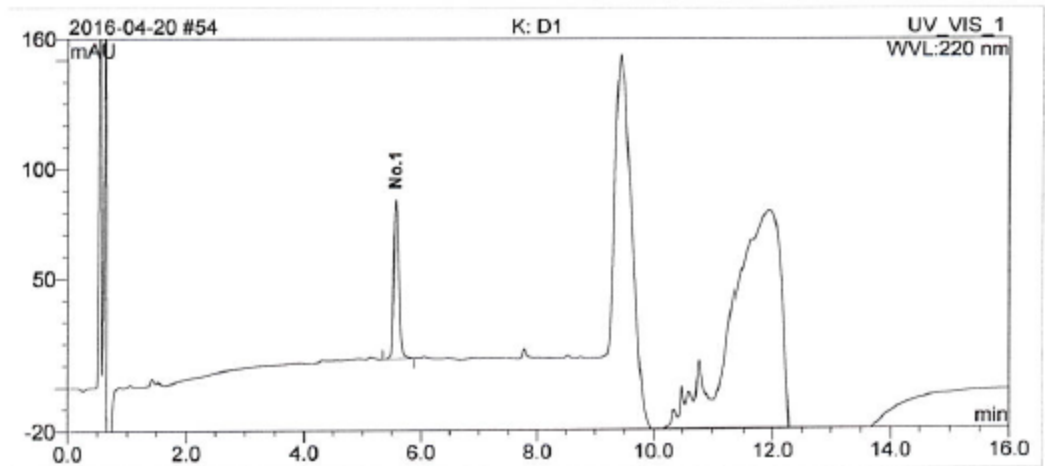
Sample Name:	K: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	21/04/16 00:11
Vial Number:	GD4	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.6800	524.201	85.946		100.0

Figure 6: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the K-containing peptide

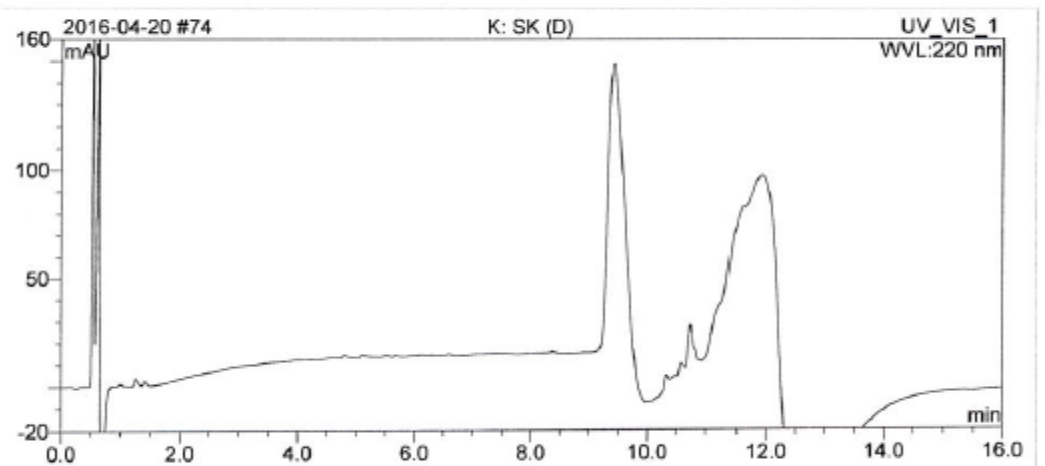
Sample Name:	K: D1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	21/04/16 01:19
Vial Number:	GD8	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.5625	444.655	73.127		100.0

Figure 7: Test substance incubated with the K-containing peptide

Sample Name:	K: SK (D)		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	21/04/16 06:56
Vial Number:	RA5	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.5625	444.655	73.127		100.0

Figure 8: Co-elution control (sample in pH 10.2 ammonium acetate buffer)

ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE

Certificate of Analysis

**Certificate of Analysis**

Page 1

Art.-No.: s0347	Name:	1,6-Hexandioldiglycidylether
CAS-Nr.: 16096-31-4	Package / Size:	2 g

Batch-No.: 801 150	Expiry date:	11/2017
--------------------	--------------	---------

Test instruction:	V-s0347	
Tests, Parameters:	Specification:	Results:
Appearance	Clear, slight yellow to yellow liquid	corresponds
Viscosity	15 – 25 mPa x s	18
Epoxy value	Min. 0.65 eq/100g	0.65
Hydrolysable chloride	Max. 0.02 eq/100g	0.01
Inorganic chloride	Max. 0.005 eq/100g	0.003
Moisture content	Max. 0.1 %	0.1
APHA	Max. 100	60

Remarks:

Declaration of the manufacturer.

Printed: 16.03.16/fl

brial allergen GmbH
Dr. Frank Lepkojus
Head of QA/QC

brial allergen GmbH, Böevemannstraße 8, 48268 Greven
Phone: +49 2571 93 97 0, Fax: +49 2571 93 97 20, E-Mail: info@brial.com, www.brial.com
CEO Dr. rer. Nat. Jürgen Brinkmann, Curtis Peter Hamann, Registrar of Companies Steinfurt HRB 2108, VAT ID-No.: DE 125 499 093, Tax-No.: 327/5789/7154

STUDY TITLE

Report

Polypropylenglykol-DGE
CAS No.: 26142-30-3

In Vitro Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay
(DPRA Test)

TEST GUIDELINE(S)

OECD 442C

AUTHOR(S)

B. Wareing B.Sc. (Study Director)

STUDY COMPLETION DATE

24 May 2016

TEST FACILITY

BASF SE

Experimental Toxicology and Ecology
67056 Ludwigshafen, Germany

TEST FACILITY PROJECT IDENTIFICATION

Project No.: 64V0579/15A202

SPONSOR

Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Klarastraße 63
79106 Freiburg, Germany

This document contains manufacturing and trade secrets of the Sponsor(s). It is the property of the Sponsor(s) and may be used only for that purpose for which it was intended by the Sponsor(s). Every other or additional use, exploitation, reproduction, publication or submission to other parties require the written permission of the Sponsor(s), with the exception of regulatory agencies acting within the limits of their administrative authority.

SIGNATURE PAGE

Study Director:

B. Wareing 24 May 2016
B. Wareing B.Sc.

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

Head of Experimental Toxicology and Ecology:

Prof. Dr. rer. nat. B. v. Ravenzwaay

Test Facility Management:

Dr. rer. nat. R. Landsiedel

Study director:

B. Wareing B.Sc.

Applied Alternative Methods:

B. Wareing B. Sc.

CONTENTS

TITLE PAGE

SIGNATURE PAGE

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

CONTENTS

1. SUMMARY
2. INTRODUCTION
 - 2.1. OBJECTIVES
 - 2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS
 - 2.3. TEST GUIDELINES
 - 2.4. TIME SCHEDULE
3. MATERIALS AND METHODS
 - 3.1. TEST ITEM
 - 3.2. TEST SYSTEM
 - 3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT
 - 3.4. CONTROLS
 - 3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION
 - 3.6. ANALYSES
 - 3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE
 - 3.7.1. Test substance solubility
 - 3.7.2. Preparation of peptide stock solutions
 - 3.7.2.1. Preparation of calibration samples
 - 3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples
 - 3.7.3. Preparation of the vehicle controls
 - 3.7.4. Preparation of the co-elution control
 - 3.7.5. Measurement of peptide concentrations
 - 3.8. DATA EVALUATION
 - 3.8.1. Calculation of the peptide concentrations
 - 3.8.2. Calculation of the peptide depletion
 - 3.9. ACCEPTANCE CRITERIA
 - 3.10. EVALUATION OF RESULTS
 - 3.10.1. Peptide depletion
 - 3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure
 - 3.11. HISTORIC CONTROL DATA
4. RESULTS
 - 4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE
 - 4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve
 - 4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile
 - 4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

4.2.	LYSINE-CONTAINING PEPTIDE
4.2.1.	Lysine-peptide calibration curve
4.2.2.	Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile
4.2.3.	Reaction with lysine-peptide
4.3.	SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES
4.4.	CO-ELUTION
4.5.	MEAN PEPTIDE DEPLETION
4.6.	HISTORIC CONTROL DATA
5.	CONCLUSION
6.	VALIDITY CRITERIA / REFERENCES
7.	LIST OF ABBREVIATIONS
APPENDIX	
SAMPLE CHROMATOGRAMS	
ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE	
Certificate of Analysis	

1. SUMMARY

The reactivity of **Polypropylenglykol-DGE, CAS No.: 26142-30-3**, towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides was evaluated in the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). For this purpose the test substance was incubated with synthetic peptides for ca. 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The test substance was dissolved at a 100 mM concentration in acetonitrile. Three samples of the test substance were incubated with each peptide in ratios of 1:10 (for C-peptide) or 1:50 (for K-peptide). Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides.

Further, a co-elution control was assessed in order to detect possible interference of the test substance with the peptides. The samples consisted of the test substance, vehicle and the respective peptide buffer but without peptide. Moreover the samples were analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm and the area ratio 220 nm/ 258 nm was calculated as a measure of peak purity.

The following results were obtained in the DPRA:

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were solutions. Visual observation after the 24-hour incubation time did not reveal precipitates in any samples of the test substance with the peptides.

No co-elution of test substance and peptides was noticed.

The mean C-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 51.21%. The mean K-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 7.21%.

Thus, the mean peptide depletion was calculated to be 29.21%.

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **Polypropylenglykol-DGE, CAS No.: 26142-30-3**, shows a moderate chemical reactivity in the DPRA under the test conditions chosen.

2. INTRODUCTION

2.1. OBJECTIVES

Chemical reactivity has been shown to be well associated with allergenic potency (Gerberick et al., 2007) and has been described as the molecular initiating event in the OECD adverse outcome pathway (OECD Publication No.168; ENV/JM/MONO(2012)10). Within this context measuring the amount of proteins with nucleophilic side chains such as cysteine or lysine residues after incubation with putative allergens serves as surrogate markers.

In the DPRA the reactivity of a test item (=test substance) towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides is evaluated. For this purpose the test substance is incubated with synthetic peptides for 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentration is determined thereafter by high performance liquid chromatography with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The peptide depletion of test-substance incubated samples is compared to the peptide depletion of the NC samples and expressed as relative peptide depletion.

Due to the complexity of the skin sensitization process a single in vitro assay is not sufficient to adequately assess this toxicological endpoint. Therefore, a combination of several methods addressing two major steps of the sensitization process: protein reactivity and activation of dendritic cells has been proposed in a strategy to assess the sensitizing potential (Bauch et al. 2012, Urbisch et al. 2015).

2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

2.3. TEST GUIDELINES

The study was conducted based on the following test guideline:

- OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

2.4. TIME SCHEDULE

Test dates:	Experimental starting date (1 st weighing of test substance for sample preparation)	16 Mar 2016
	Sample preparation (C- and K-peptide)	16 Mar 2016
	Experimental completion date (documentation of check of raw data)	23 Mar 2016

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. TEST ITEM

The test item (= test substance) was used with the given specifications of the producer (Sigma – Aldrich). No further analyses were conducted.

Name of test substance:	Polypropylenglykol-DGE
Test-substance No.:	15/0579-1
Batch identification:	MKBQ0052V
CAS No.:	26142-30-3
Purity / Contents:	As purity/contents was not available a purity of 100% was assumed and used for calculation of the 100 mM test-substance preparation.
Identity:	Confirmed (see Certificate of Analysis in the Appendix)
Homogeneity:	The test substance was homogeneous by visual inspection.
Date of expiry:	05 Jan 2017

ADDITIONAL TEST-SUBSTANCE INFORMATION

Physical state / color:	Liquid / colorless, clear
Molecular weight:	150 g/mol (calculated from formula: C ₆ H ₁₄ O ₄)
Log Kow:	not available
Proposed reaction mechanism for protein binding by OECD toolbox:	not available

3.2. TEST SYSTEM

Synthetic peptides: Cysteine- (C-) containing peptide:
Ac-RFAACAA-COOH (MW=751.9 g/mol)
Lysine- (K-) containing peptide:
Ac-RFAAKAA-COOH (MW=776.2 g/mol)
The peptides are custom material (Supplier: GenScript, Picataway, NJ, USA and/or RS Synthesis, Louisville KY, USA) containing phenylalanine to aid in detection and either cysteine or lysine as the reactive center.

3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT

HPLC: Liquid chromatograph Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000 consisting of the following modules:

Pump: HPG-3400RS

Autosampler: WPS-3000TSL

Column oven: TCC-3000

UV-Detector: DAD-3000

Column: ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 μ m with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)

HPLC mobile phase A: H₂O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V

HPLC mobile phase B: ACN/H₂O/TFA 950/50/0.85 V/V/V

Incubator: Midi 40 Incubator (Thermo Scientific)

pH meter: Readability +/- 0.1 pH units.
For adjusting pH-values of buffers.

Reagents for preparing for pH 7.5 phosphate buffer (used for solving C-containing peptide):
the buffers:

Sodium phosphate, monobasic monohydrate, CAS no. 10049-21-5
(e.g. Sigma-Aldrich S9638)

Sodium phosphate, dibasic heptahydrate, CAS no. 7782-85-6
(e.g. Sigma-Aldrich S9390)

for pH 10.2 ammonium acetate buffer (used for solving K-containing peptide):

Ammonium acetate, CAS no. 631-61-8
(e.g. Sigma-Aldrich 32301)

Ammonium hydroxide, 28% – 30%, CAS no. 1336-21-6
(e.g. Sigma-Aldrich 320145)

3.4. CONTROLS

Negative control (NC): vehicle control = acetonitrile

Positive control (PC): Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA; CAS-no. 97-90-5), prepared as a 50 mM solution in acetonitrile.

Co-elution control: Sample prepared of the respective peptide buffer and the test substance but without peptide.

3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION

The test substance solution was prepared on a weight per volume basis within 4 hours of performing the assay (preparation of samples).

Test-substance preparation: The test substance was prepared as a 100 mM solution in acetonitrile. After short stirring the test substance was soluble in the vehicle.

Vehicle: acetonitrile

Reason for the vehicle: The test substance was soluble in acetonitrile.

3.6. ANALYSES

Because the test-substance preparation was incubated with the peptide shortly after preparation, no analysis of the test substance in the vehicle was performed.

3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE

The test substance was dissolved in a suitable vehicle. Three samples of the test substance were incubated with each peptide. Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides. The remaining non-depleted peptide concentration was determined thereafter by HPLC with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

In addition calibration samples of known peptide concentration, prepared from the respective peptide stock solution used for test-substance incubation, were measured in parallel with the same analytical method.

3.7.1. Test substance solubility

Prior to the assay the solubility of the test substance was tested. A suitable non-reactive, water-miscible solvent which dissolves the test substance completely (no visible precipitation or cloudiness of the test-substance preparation) should be used. The preferred solvent was acetonitrile. When not soluble in acetonitrile solutions in water, isopropanol, acetone, propanol, methanol or mixtures of these solvents were tried.

3.7.2. Preparation of peptide stock solutions

Peptide stock solutions in a concentration of 0.667 mM were prepared in pH 7.5 phosphate buffer (C-containing peptide) or pH 10.2 ammonium acetate buffer (K-containing peptide). The peptide stock solution was used for preparing the calibration samples and the test-substance and control samples.

3.7.2.1. Preparation of calibration samples

The following calibration samples were prepared from the peptide stock solutions in 20% acetonitrile:buffer (= dilution buffer) using serial dilution:

Table 1: Calibration samples of DPRA.

	Calib. 1	Calib. 2	Calib. 3	Calib. 4	Calib. 5	Calib. 6	Dilution buffer
mM peptide	0.534	0.267	0.134	0.067	0.033	0.017	0.000

The analysis of the calibration samples was started before analysis of the test-substance samples.

3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples

The samples were prepared in triplicates for each peptide.

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

The samples were prepared in suitable tubes, capped tightly and incubated at 25°C ± 2.5°C in the dark for 24 +/- 2 hours. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period. The HPLC analysis of the batch of samples started about 24 hours after sample preparation and the analysis time itself did not exceed 30 hours.

3.7.3. Preparation of the vehicle controls

Several acetonitrile controls were prepared in triplicates in the same way as the test-substance samples described above but with acetonitrile instead of the test substance: One set (set A) was analyzed together with the calibration samples without incubation and serves as a performance control. Another three sets (two sets B and set C) were prepared and incubated with the samples. Sets B were placed at the very start and ending of the sample list and serve as stability control of the peptide over the analysis time. Set C was analyzed with the samples and serves for calculation of the peptide depletion of any chemical formulated in acetonitrile.

3.7.4. Preparation of the co-elution control

The co-elution control was prepared in the same way as the test-substance samples described above but without the peptide. Instead the respective peptide buffer was used. The samples were analyzed together with the calibration samples. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period.

3.7.5. Measurement of peptide concentrations

The analyses of the samples were performed via HPLC under the following conditions:

Table 2: HPLC conditions used for analysis of DPRA samples.

Column:	ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 µm with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)														
Eluent:	A: H2O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V B: ACN/H2O/TFA 950/50/0.85 V/V/V														
Flow:	0.50 mL/min														
Gradient:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>time [min]</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>8.1</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.1</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	time [min]	%B	0	5	8	20	8.1	90	10	90	10.1	5	16	5
time [min]	%B														
0	5														
8	20														
8.1	90														
10	90														
10.1	5														
16	5														
Wavelength:	220 nm and 258 nm														
Injection volume:	2 µL														
Software:	Dionex Chromeleon														

3.8. DATA EVALUATION

Table(s) and/or figure(s) of measured parameters presented in the report were produced using PC based tabular calculation software. The mean and individual data were not always rounded but the significant digits were produced by changing the display format. As a consequence, calculation of mean values using the individual data presented in the report will, in some instances, yield minor variations in value.

The integrated peak areas were transferred electronically into EXCEL data spreadsheets to carry out the necessary calculations.

Some test substances or reaction products may co-eluate with the peptides. In these cases where proper integration and calculation of peptide depletion was not possible, the result for the respective peptide is reported as interference.

When samples were additionally analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm, the area ratio 220 nm/ 258 nm may be calculated and serve as a measure of peak purity. The ratio of a pure peptide peak should be consistent over all samples (100% ± 10% of the mean of the vehicle controls). However, due to small peak areas calculation of the area ratio may not be possible for all samples.

3.8.1. Calculation of the peptide concentrations

For each peptide a calibration curve was generated from the measured peak areas of the calibration samples of known peptide concentration.

The peptide concentration of the samples was calculated with the respective calibration curve using linear regression (b = axis intercept; m = slope).

$$\text{Peptide concentration [mM]} = \frac{\text{peak area [mAU} \times s] - b}{m}$$

3.8.2. Calculation of the peptide depletion

The peptide depletion of a sample was calculated as follows:

$$\text{Peptide depletion of sample} = \left[1 - \frac{\text{peptide concentration of sample (mM)}}{\text{mean peptide concentration of NC (mM)}} \right] \times 100 \quad [\%]$$

The mean peptide depletion for each of the two peptides was calculated as the mean value of the three samples conducted for each peptide and test substance (C-containing and K-containing peptide depletion; example calculation for C-containing peptide):

$$\text{C - containing peptide depletion of a test substance} [\%] = \text{mean} [\text{C - containing peptide depletion of samples 1-3}] [\%]$$

When a negative value for C- or K-peptide depletion was obtained the value was considered zero for calculation of the mean peptide depletion.

The mean peptide depletion of a test substance was calculated as the mean value of C-containing peptide depletion and K-containing peptide depletion:

$$\text{Mean peptide depletion [\%]} = \frac{\text{C - containing peptide depletion [\%]} + \text{K - containing peptide depletion [\%]}}{2}$$

3.9. ACCEPTANCE CRITERIA

If any of the acceptance criteria mentioned below is not met, repetition of the test is considered. In the case of an unambiguous result the study director may decide that an experiment is valid despite a deviation of acceptance criteria. However, reasonable justification must then be given.

The standard calibration curve should have an $r^2 > 0.99$.

The negative control (vehicle control) samples of sets A and C should be 0.50 mM +/- 0.05 mM.

The CV of the nine vehicle controls B and C should be < 15%.

Since the mean peptide depletion for each peptide is determined from the mean of three single samples, the variability between these samples should be acceptably low (SD <14.9% for % cysteine depletion and <11.6% for % lysine depletion).

In addition, the positive control should cause depletion of both peptides comparable to historic data.

3.10. EVALUATION OF RESULTS

3.10.1. Peptide depletion

Chemical reactivity was determined by mean peptide depletion [%] and was rated as high, moderate, low, or minimal:

Table 3: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model.

Mean peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 42.47	high reactivity	positive
> 22.62 ≤ 42.47	moderate reactivity	positive
> 8.11 ≤ 22.62	low reactivity	positive
> 4.65 ≤ 8.11	no to low reactivity	borderline ¹
≤ 4.65	minimal or no reactivity	negative

In the case mean peptide depletion [%] cannot be determined due to invalid K-peptide depletion (e.g. insolubility of the K-peptide samples or interference in the samples of the K-peptide) but valid C-peptide depletion is available, evaluation is performed as follows:

Table 4: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 prediction model.

C peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 98.24	high reactivity	positive
> 23.09 ≤ 98.24	moderate reactivity	positive
> 17.28 ≤ 23.09	low reactivity	positive
> 10.50 ≤ 17.28	no to low reactivity	borderline ²
≤ 10.50	minimal or no reactivity	negative

¹ The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 6.38 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 6.38 ≤ 22.62 as “positive” (low reactivity).

² The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 13.89 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 13.89 ≤ 23.09 as “positive” (low reactivity).

3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure

For test substances that are not completely soluble by visual observation in the sample preparations containing the peptides immediately after preparation or after 24 hours, or when a gravimetric procedure is applied (with the exception of application of the undiluted test substance), the result may be under-predictive due to limited availability of the test substance. In this case mean peptide reactivity < 8.11% (Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model) or < 17.28% (Cysteine 1:10 prediction model) is interpreted as “inconclusive”. However, a mean peptide depletion > 8.11% or > 17.28% is considered as “positive”.

3.11. HISTORIC CONTROL DATA

Historic control values of negative and positive controls, gathered over an appropriate time period, are presented in section 4.6. These data demonstrate the reproducibility of results and robustness of the procedures. They are used to derive suitable acceptance criteria (see section 3.9) for the test system.

4. RESULTS

For sample chromatograms of the vehicle control, co-elution control and test-substance samples see Appendix.

4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE

4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
C: Calib. 1	0.534	688.9	17.5	39.3		
C: Calib. 2	0.267	356.4	8.7	41.1	Slope:	1292.5
C: Calib. 3	0.134	186.9	4.5	41.9	Axis intercept:	4.353
C: Calib. 4	0.067	90.6	n.a.	-	Correlation:	0.99970
C: Calib. 5	0.033	44.9	n.a.	-		
C: Calib. 6	0.017	21.6	n.a.	-		
C: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

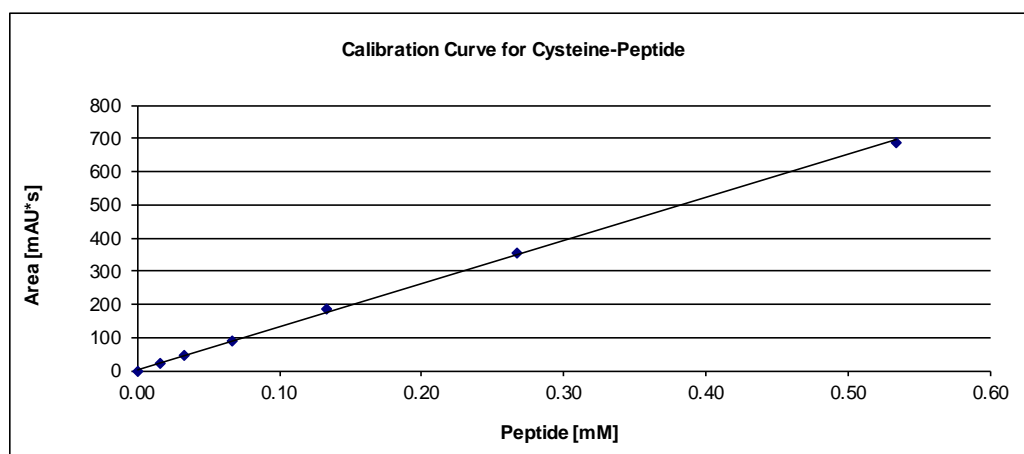


Figure 1: Calibration curve for Cysteine peptide

4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.501 mM with a SD of 0.002 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.497 mM with a SD of 0.005 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.494 mM with a SD of 0.006 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.9%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.1.3.

4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

Table 5: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	650.3	645.1	646.3	0.500	0.496	0.497	0.497	0.002
Polypropylenglykol-DGE	332.0	317.5	304.5	0.254	0.242	0.232	0.243	0.011
PC: EGDMA in ACN	352.9	337.9	322.9	0.270	0.258	0.246	0.258	0.012

Reaction with cysteine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	-0.48	0.34	0.14	0.00	0.43
Polypropylenglykol-DGE	49.03	51.30	53.31	51.21	2.14
PC: EGDMA in ACN	45.79	48.12	50.45	48.12	2.33

Table 6: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	16.4	16.3	16.4	39.7	39.5	39.5
Polypropylenglykol-DGE	8.1	7.8	7.5	40.9	40.8	40.7
PC: EGDMA in ACN	9.0	8.6	8.2	39.3	39.3	39.5

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 39.4. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 103.4% to 104.0% of the mean of the vehicle controls.

4.2. LYSINE-CONTAINING PEPTIDE

4.2.1. Lysine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
K: Calib. 1	0.534	556.1	14.3	39.0		
K: Calib. 2	0.267	285.9	7.3	39.2	Slope:	1040.6
K: Calib. 3	0.134	146.9	n.a.	-	Axis intercept:	3.598
K: Calib. 4	0.067	71.8	n.a.	-	Correlation:	0.99987
K: Calib. 5	0.033	38.3	n.a.	-		
K: Calib. 6	0.017	20.1	n.a.	-		
K: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

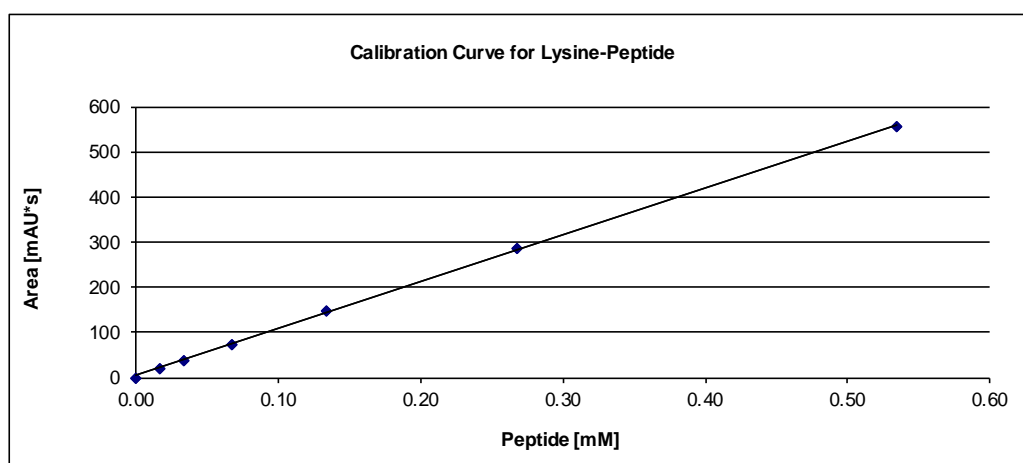


Figure 2: Calibration curve for Lysine peptide

4.2.2. Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.521 mM with a SD of 0.004 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.503 mM with a SD of 0.004 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.504 mM with a SD of 0.003 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 1.1%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.2.3.

4.2.3. Reaction with lysine-peptide

Table 7: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	527.6	542.2	527.9	0.504	0.518	0.504	0.508	0.008
Polypropylenglykol-DGE	494.2	493.0	496.1	0.472	0.470	0.473	0.472	0.001
PC: EGDMA in ACN	471.6	470.4	471.7	0.450	0.449	0.450	0.449	0.001

Reaction with lysine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	0.94	-1.82	0.88	0.00	1.58
Polypropylenglykol-DGE	7.25	7.48	6.90	7.21	0.29
PC: EGDMA in ACN	11.53	11.77	11.51	11.60	0.14

Table 8: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	12.7	12.5	12.8	41.7	43.3	41.1
Polypropylenglykol-DGE	12.3	12.7	12.8	40.2	38.8	38.6
PC: EGDMA in ACN	11.9	11.9	11.9	39.6	39.4	39.5

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 40.4. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 95.5% to 99.3% of the mean of the vehicle controls.

4.3. SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES

The test substance was dissolved in acetonitrile. The samples of the test substance with the peptides were solutions. Visual observation after the 24-hour incubation time did not reveal precipitates in any samples of the test substance with the peptides.

4.4. CO-ELUTION

No co-elution of the test substance and peptides occurred as demonstrated by the consistent values of the area ratios 220 nm/258 nm (for values see sections 4.1.3 and 4.2.3) and chromatograms of the co-elution control in the Appendix.

4.5. MEAN PEPTIDE DEPLETION

The mean peptide depletion as average of cysteine- and lysine-peptide depletions is calculated and summarized in the table below.

Table 9: Mean peptide depletions of Cysteine, Lysine and both peptides.

	Cysteine-Peptide		Lysine-Peptide		mean of both depletions [%]
	mean depletion [%]	SD [%]	mean depletion [%]	SD [%]	
Polypropylenglykol-DGE	51.21	2.14	7.21	0.29	29.21
PC: EGDMA in ACN	48.12	2.33	11.60	0.14	29.86

4.6. HISTORIC CONTROL DATA

The acceptance criteria mentioned in section 3.9 were met.

The positive control caused depletion of both peptides is comparable to historic data as can be seen in the following tables:

Table 10: Historic control data of negative control / vehicle control.

Acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	K-peptide concentration [mM]
Min	0.447	0.451
Max	0.542	0.541
Mean	0.484	0.503
SD	0.017	0.014
n	49	51

Table 11: Historic control data of positive control.

EGDMA, 50 mM in acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Feb 2016

	C-peptide concentration [mM]	C-peptide depletion [%]	K-peptide concentration [mM]	K-peptide depletion [%]
Min	0.058	43.32	0.373	7.99
Max	0.282	88.30	0.489	25.24
Mean	0.211	56.36	0.429	15.27
SD	0.040	8.09	0.024	3.23
n		31		31

5. CONCLUSION

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **Polypropylenglykol-DGE, CAS No.: 26142-30-3, shows a moderate chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

6. VALIDITY CRITERIA / REFERENCES

Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Eltze 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(3):489-504.

Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittenvin JP. (2007) Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicological Sciences* 97(2), 417-427.

OECD 2012: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins (2012) OECD ENVIRONMENT, HEALTH AND SAFETY PUBLICATIONS: No.168; ENV/JM/MONO(2012)10
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en) last accessed 05 Feb 2013.

OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle SN, Landsiedel R, Jaworska J, Kern P, 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. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71(2), 135-352.

7. LIST OF ABBREVIATIONS

The following list contains abbreviations and definitions generally used in reports for this study type. This report will not necessarily use all expressions listed below.

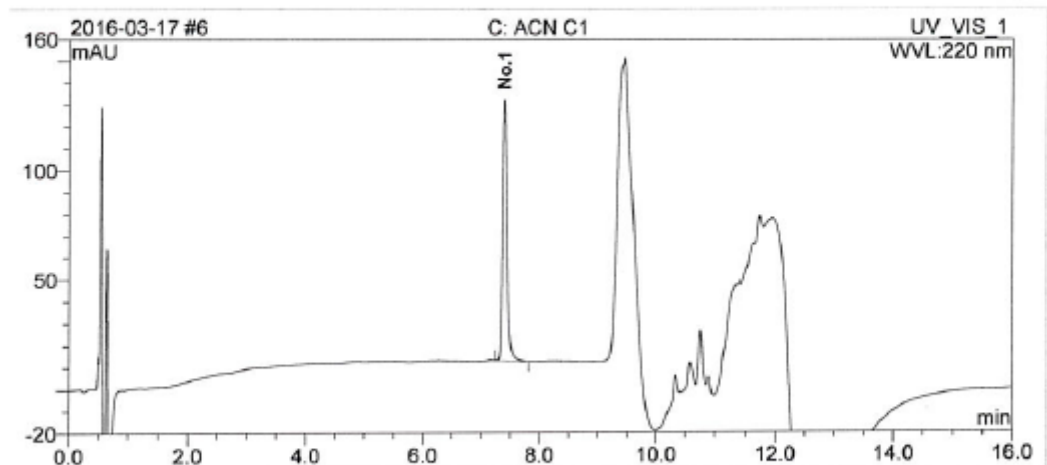
A	= alanine
AC	= acetone
Ac	= acetyl group
ACN	= acetonitrile
approx..	= approximately
C	= cysteine
ca.	= circa
Calib.	= calibration sample
cm	= centimeter
cm ²	= square centimeter
COOH	= carboxyl group
CV	= coefficient of variation
d	= day
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DTT	= dithiothreitol
EGDMA	= ethylene glycol dimethacrylate
F	= phenylalanine
G; g	= gram
h	= hour
IPA	= isopropyl alcohol (isopropanol)
K	= lysine
M	= mol / liter
mAU	= milli absorbance units
MeOH	= methanol
mg	= milligram
µg	= microgram
Min, min	= minute(s)
µL	= microliter
mL	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimol / liter
µm	= micrometer
MW	= Molecular weight

n.a.	= not assigned
NC	= negative control
No.; no.	= number
nm	= nanometer
p.a.	= per analysis
PC	= positive control
PrOH	= propanol
R	= arginine
SD	= standard deviation
SK	= co-elution control (Substanzkontrolle)
STD	= standard
TFA	= trifluoroacetic acid
UV	= ultraviolet
v/v	= volume / volume
Symbols:	
°C	= degree Celsius
~	= circa
=	= analogous
%	= per cent
∅	= diameter

APPENDIX

SAMPLE CHROMATOGRAMS

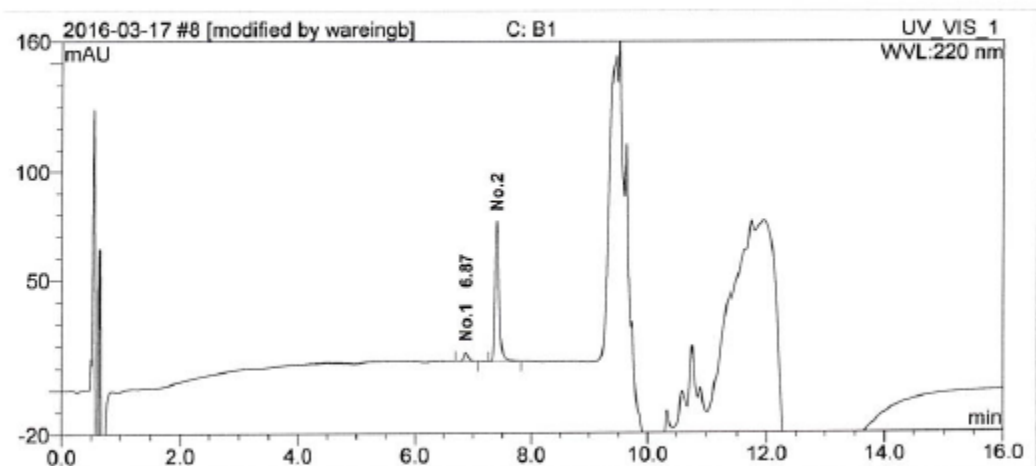
Sample Name:	C: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	17/03/16 12:20
Vial Number:	RA5	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	7.3875	650.306	119.438		100.0

Figure 3: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the C-containing peptide

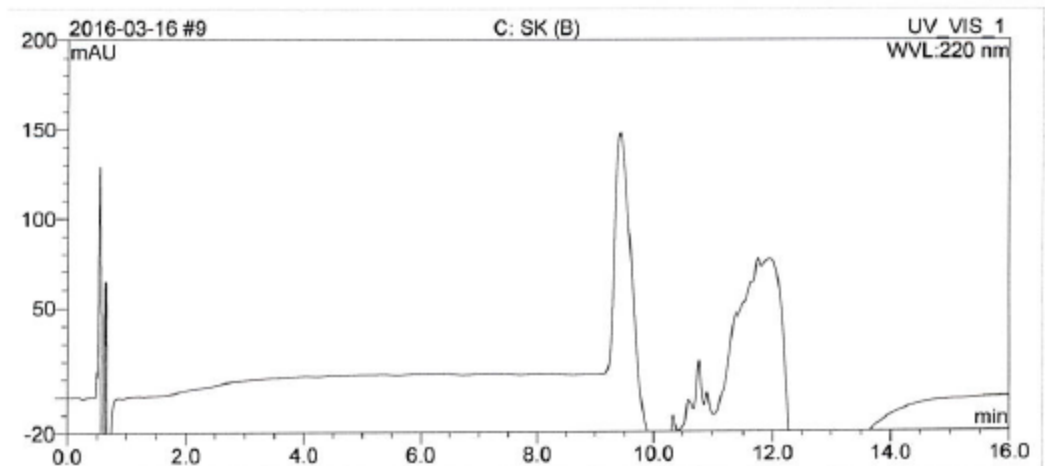
Sample Name:	C: B1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	17/03/16 12:54
Vial Number:	RA7	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	6.8742	21.497	4.174		6.1
2	7.4025	332.032	63.987	353.528	93.9

Figure 4: Test substance incubated with the C-containing peptide

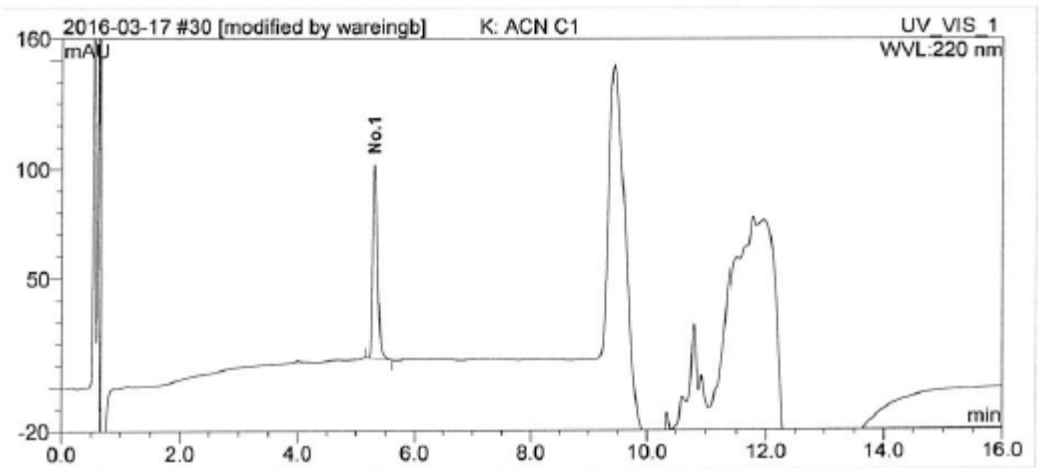
Sample Name:	C: SK (B)		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	16/03/16 14:25
Vial Number:	RA8	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
-----	--------------	------------	------------	----------------	------------

Figure 5: Co-elution control (sample in pH 7.5 phosphate buffer)

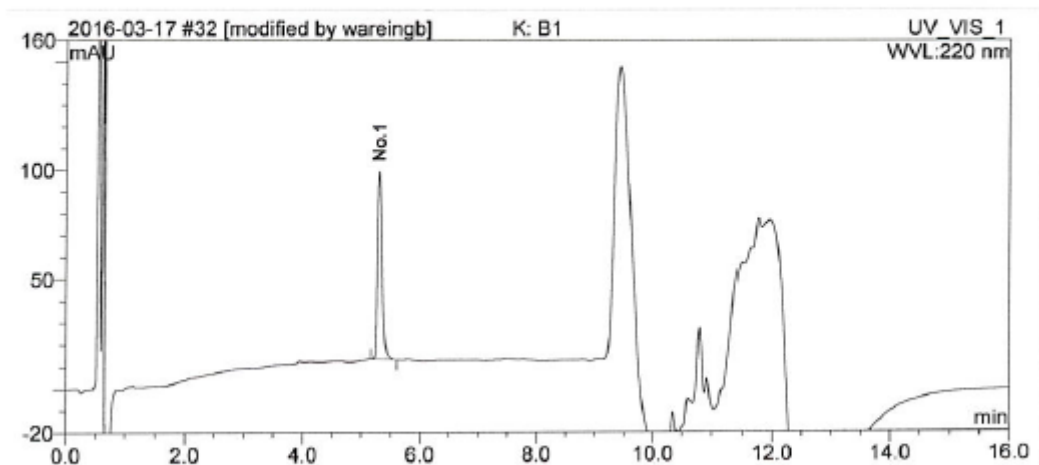
Sample Name:	K: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	17/03/16 19:05
Vial Number:	RD5	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.3050	527.602	89.001		100.0

Figure 6: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the K-containing peptide

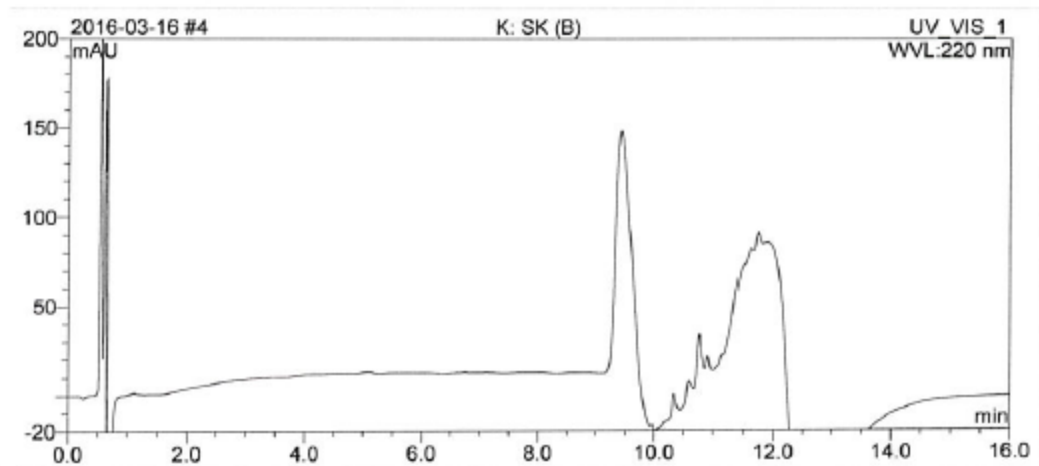
Sample Name:	K: B1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RD7	Recording Time:	17/03/16 19:39
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.2983	494.230	85.971		100.0

Figure 7: Test substance incubated with the K-containing peptide

Sample Name:	K: SK (B)		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RA3	Recording Time:	16/03/16 13:01
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen Quantif. Method:		Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.2983	494.230	85.971		100.0

Figure 8: Co-elution control (sample in pH 10.2 ammonium acetate buffer)

ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE

Certificate of Analysis

1510579-1
d added
06-01-16 JB

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:

Poly(propylene glycol) diglycidyl ether - average M_n ~380

Product Number:

406732

Batch Number:

MKBQ0052V

Brand:

ALDRICH

CAS Number:

26142-30-3

MDL Number:

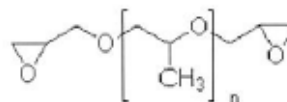
MFCD00130930

Formula:

C₈H₁₄O₄

Quality Release Date:

20 AUG 2013



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless to Pale Yellow	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Viscosity	30.0 - 60.0 cps	34.6 cps
At 25 Degrees Celsius		

Jamie Gleason, Manager
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

STUDY TITLE

Report

Trimethylolpropan-TGE
CAS No.: 30499-70-8; 3454-29-3In Vitro Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay
(DPRA Test)**TEST GUIDELINE(S)**

OECD 442C

AUTHOR(S)

B. Wareing B.Sc. (Study Director)

STUDY COMPLETION DATE

24 May 2016

TEST FACILITY

BASF SE

Experimental Toxicology and Ecology
67056 Ludwigshafen, Germany**TEST FACILITY PROJECT IDENTIFICATION**

Project No.: 64V0580/15A203

SPONSORForschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Klarastraße 63
79106 Freiburg, Germany

This document contains manufacturing and trade secrets of the Sponsor(s). It is the property of the Sponsor(s) and may be used only for that purpose for which it was intended by the Sponsor(s). Every other or additional use, exploitation, reproduction, publication or submission to other parties require the written permission of the Sponsor(s), with the exception of regulatory agencies acting within the limits of their administrative authority.

SIGNATURE PAGE

Study Director:

B. Wareing 24 May 2016
B. Wareing B.Sc.

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

Head of Experimental Toxicology and Ecology:

Prof. Dr. rer. nat. B. v. Ravenzwaay

Test Facility Management:

Dr. rer. nat. R. Landsiedel

Study director:

B. Wareing B.Sc.

Applied Alternative Methods:

B. Wareing B.Sc.

CONTENTS

TITLE PAGE

SIGNATURE PAGE

CONTRIBUTORS TO THE STUDY / SUPERVISORY LABORATORY PERSONNEL

CONTENTS

1. SUMMARY
2. INTRODUCTION
 - 2.1. OBJECTIVES
 - 2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS
 - 2.3. TEST GUIDELINES
 - 2.4. TIME SCHEDULE
3. MATERIALS AND METHODS
 - 3.1. TEST ITEM
 - 3.2. TEST SYSTEM
 - 3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT
 - 3.4. CONTROLS
 - 3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION
 - 3.6. ANALYSES
 - 3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE
 - 3.7.1. Test substance solubility
 - 3.7.2. Preparation of peptide stock solutions
 - 3.7.2.1. Preparation of calibration samples
 - 3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples
 - 3.7.3. Preparation of the vehicle controls
 - 3.7.4. Preparation of the co-elution control
 - 3.7.5. Measurement of peptide concentrations
 - 3.8. DATA EVALUATION
 - 3.8.1. Calculation of the peptide concentrations
 - 3.8.2. Calculation of the peptide depletion
 - 3.9. ACCEPTANCE CRITERIA
 - 3.10. EVALUATION OF RESULTS
 - 3.10.1. Peptide depletion
 - 3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure
 - 3.11. HISTORIC CONTROL DATA
4. RESULTS
 - 4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE
 - 4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve
 - 4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile
 - 4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

4.2.	LYSINE-CONTAINING PEPTIDE
4.2.1.	Lysine-peptide calibration curve
4.2.2.	Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile
4.2.3.	Reaction with lysine-peptide
4.3.	SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES
4.4.	CO-ELUTION
4.5.	MEAN PEPTIDE DEPLETION
4.6.	HISTORIC CONTROL DATA
5.	CONCLUSION
6.	VALIDITY CRITERIA / REFERENCES
7.	LIST OF ABBREVIATIONS
APPENDIX	
SAMPLE CHROMATOGRAMS	
ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE	
Certificate of Analysis	

1. SUMMARY

The reactivity of **Trimethylolpropan-TGE, CAS No.: 30499-70-8; 3454-29-3**, towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides was evaluated in the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). For this purpose the test substance was incubated with synthetic peptides for ca. 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The test substance was dissolved at a 100 mM concentration in acetonitrile. Three samples of the test substance were incubated with each peptide in ratios of 1:10 (for C-peptide) or 1:50 (for K-peptide). Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides.

Further, a co-elution control was assessed in order to detect possible interference of the test substance with the peptides. The samples consisted of the test substance, vehicle and the respective peptide buffer but without peptide. Moreover the samples were analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm and the area ratio 220 nm/ 258 nm was calculated as a measure of peak purity.

The following results were obtained in the DPRA:

The test substance was soluble in acetonitrile. The samples of the test substance with the C-peptide were solutions at the time of preparation and after 24 hours. The samples of the test substance and the K-peptide were emulsions at the time of preparation and after 24 hours. Thus the samples of the K-peptide were centrifuged prior to HPLC analysis.

No co-elution of test substance and peptides was noticed.

The mean C-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 53.45%. The mean K-peptide depletion, caused by the test substance was determined to be 13.63%.

Due to the insolubility of the test substance in the K-peptide samples calculation of mean peptide depletion is not applicable and the Cysteine 1:10 prediction model is used for evaluation.

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **Trimethylolpropan-TGE, CAS No.: 30499-70-8; 3454-29-3, shows a moderate chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

2. INTRODUCTION

2.1. OBJECTIVES

Chemical reactivity has been shown to be well associated with allergenic potency (Gerberick et al., 2007) and has been described as the molecular initiating event in the OECD adverse outcome pathway (OECD Publication No.168; ENV/JM/MONO(2012)10). Within this context measuring the amount of proteins with nucleophilic side chains such as cysteine or lysine residues after incubation with putative allergens serves as surrogate markers.

In the DPRA the reactivity of a test item (=test substance) towards synthetic cysteine (C)- or lysine (K)-containing peptides is evaluated. For this purpose the test substance is incubated with synthetic peptides for 24 hours at ca. 25°C and the remaining non-depleted peptide concentration is determined thereafter by high performance liquid chromatography with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

The peptide depletion of test-substance incubated samples is compared to the peptide depletion of the NC samples and expressed as relative peptide depletion.

Due to the complexity of the skin sensitization process a single in vitro assay is not sufficient to adequately assess this toxicological endpoint. Therefore, a combination of several methods addressing two major steps of the sensitization process: protein reactivity and activation of dendritic cells has been proposed in a strategy to assess the sensitizing potential (Bauch et al. 2012, Urbisch et al. 2015).

2.2. SELECTION OF CONCENTRATIONS

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

2.3. TEST GUIDELINES

The study was conducted based on the following test guideline:

- OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

2.4. TIME SCHEDULE

Test dates:	Experimental starting date (1 st weighing of test substance for sample preparation)	19 Apr 2016
	Sample preparation (C- and K-peptide)	19 Apr 2016
	Experimental completion date (documentation of check of raw data)	18 May 2016

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. TEST ITEM

The test item (= test substance) was used with the given specifications of the producer (Sigma – Aldrich). No further analyses were conducted.

Name of test substance:	Trimethylolpropan-TGE
Test-substance No.:	15/0580-1
Batch identification:	MKBQ5700V
CAS No.:	30499-70-8 3454-29-3
Purity / Contents:	As purity/contents was not available a purity of 100% was assumed and used for calculation of the 100 mM test-substance preparation.
Identity:	Confirmed (see Certificate of Analysis in the Appendix)
Homogeneity:	The test substance was homogeneous by visual inspection.
Date of expiry:	05 Jan 2017

ADDITIONAL TEST-SUBSTANCE INFORMATION

Physical state / color:	Liquid / colorless, clear
Molecular weight:	302.36 g/mol
Log K _{ow} :	-0.5 (calculated)
Proposed reaction mechanism for protein binding by OECD toolbox:	The OECD toolbox proposed the following reaction mechanism for protein binding for either the substance or its predicted metabolites (auto-oxidation, hydrolysis, and skin metabolism): nucleophilic substitution

3.2. TEST SYSTEM

Synthetic peptides: Cysteine- (C-) containing peptide:
Ac-RFAACAA-COOH (MW=751.9 g/mol)
Lysine- (K-) containing peptide:
Ac-RFAAKAA-COOH (MW=776.2 g/mol)
The peptides are custom material (Supplier: GenScript, Picataway, NJ, USA and/or RS Synthesis, Louisville KY, USA) containing phenylalanine to aid in detection and either cysteine or lysine as the reactive center.

3.3. MATERIAL AND TECHNICAL EQUIPMENT

HPLC: Liquid chromatograph Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000 consisting of the following modules:

Pump: HPG-3400RS

Autosampler: WPS-3000TSL

Column oven: TCC-3000

UV-Detector: DAD-3000

Column: ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 μ m with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)

HPLC mobile phase A: H₂O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V

HPLC mobile phase B: ACN/H₂O/TFA 950/50/0.85 V/V/V

Incubator: Midi 40 Incubator (Thermo Scientific)

pH meter: Readability +/- 0.1 pH units.
For adjusting pH-values of buffers.

Reagents for preparing for pH 7.5 phosphate buffer (used for solving C-containing peptide):
the buffers:

Sodium phosphate, monobasic monohydrate, CAS no. 10049-21-5
(e.g. Sigma-Aldrich S9638)

Sodium phosphate, dibasic heptahydrate, CAS no. 7782-85-6
(e.g. Sigma-Aldrich S9390)

for pH 10.2 ammonium acetate buffer (used for solving K-containing peptide):

Ammonium acetate, CAS no. 631-61-8
(e.g. Sigma-Aldrich 32301)

Ammonium hydroxide, 28% – 30%, CAS no. 1336-21-6
(e.g. Sigma-Aldrich 320145)

3.4. CONTROLS

Negative control (NC): vehicle control = acetonitrile

Positive control (PC): Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA; CAS-no. 97-90-5), prepared as a 50 mM solution in acetonitrile.

Co-elution control: Sample prepared of the respective peptide buffer and the test substance but without peptide.

3.5. TEST-SUBSTANCE PREPARATION

The test substance solution was prepared on a weight per volume basis within 4 hours of performing the assay (preparation of samples).

Test-substance preparation: The test substance was prepared as a 100 mM solution in acetonitrile. After short stirring the test substance was soluble in the vehicle.

Vehicle: acetonitrile

Reason for the vehicle: The test substance was soluble in acetonitrile.

3.6. ANALYSES

Because the test-substance preparation was incubated with the peptide shortly after preparation, no analysis of the test substance in the vehicle was performed.

3.7. EXPERIMENTAL PROCEDURE

The test substance was dissolved in a suitable vehicle. Three samples of the test substance were incubated with each peptide. Additionally triplicates of the concurrent vehicle control (= NC) were incubated with the peptides. The remaining non-depleted peptide concentration was determined thereafter by HPLC with gradient elution and UV-detection at 220 nm.

In addition calibration samples of known peptide concentration, prepared from the respective peptide stock solution used for test-substance incubation, were measured in parallel with the same analytical method.

3.7.1. Test substance solubility

Prior to the assay the solubility of the test substance was tested. A suitable non-reactive, water-miscible solvent which dissolves the test substance completely (no visible precipitation or cloudiness of the test-substance preparation) should be used. The preferred solvent was acetonitrile. When not soluble in acetonitrile solutions in water, isopropanol, acetone, propanol, methanol or mixtures of these solvents were tried.

3.7.2. Preparation of peptide stock solutions

Peptide stock solutions in a concentration of 0.667 mM were prepared in pH 7.5 phosphate buffer (C-containing peptide) or pH 10.2 ammonium acetate buffer (K-containing peptide). The peptide stock solution was used for preparing the calibration samples and the test-substance and control samples.

3.7.2.1. Preparation of calibration samples

The following calibration samples were prepared from the peptide stock solutions in 20% acetonitrile:buffer (= dilution buffer) using serial dilution:

Table 1: Calibration samples of DPRA.

	Calib. 1	Calib. 2	Calib. 3	Calib. 4	Calib. 5	Calib. 6	Dilution buffer
mM peptide	0.534	0.267	0.134	0.067	0.033	0.017	0.000

The analysis of the calibration samples was started before analysis of the test-substance samples.

3.7.2.2. Preparation of the test-substance samples

The samples were prepared in triplicates for each peptide.

The C-containing peptide was incubated with the test substance in a ratio of 1:10 (0.5 mM peptide, 5 mM test substance) and the K-containing peptide in a ratio of 1:50 (0.5 mM peptide, 25 mM test substance).

The samples were prepared in suitable tubes, capped tightly and incubated at 25°C ± 2.5°C in the dark for 24 +/- 2 hours. Prior to HPLC analysis the samples were visually investigated for any precipitate that may have formed during the exposure period. Samples that were visually turbid or displayed precipitates were centrifuged prior to injection into the HPLC in order to remove any unsolved particles. The HPLC analysis of the batch of samples started about 24 hours after sample preparation and the analysis time itself did not exceed 30 hours.

3.7.3. Preparation of the vehicle controls

Several acetonitrile controls were prepared in triplicates in the same way as the test-substance samples described above but with acetonitrile instead of the test substance: One set (set A) was analyzed together with the calibration samples without incubation and serves as a performance control. Another three sets (two sets B and set C) were prepared and incubated with the samples. Sets B were placed at the very start and ending of the sample list and serve as stability control of the peptide over the analysis time. Set C was analyzed with the samples and serves for calculation of the peptide depletion of any chemical formulated in acetonitrile.

3.7.4. Preparation of the co-elution control

The co-elution control was prepared in the same way as the test-substance samples described above but without the peptide. Instead the respective peptide buffer was used. The samples were analyzed together with the calibration samples. Samples that were visually turbid or displayed precipitates they were centrifuged prior to injection into the HPLC in order to remove any unsolved particles.

3.7.5. Measurement of peptide concentrations

The analyses of the samples were performed via HPLC under the following conditions:

Table 2: HPLC conditions used for analysis of DPRA samples.

Column:	ZORBAX SB-C18 2.1 x 100 mm, 3.5 µm with guard column SecurityGuard Ultra Cartridges, UHPLC C18 for 4.6 mm ID (Phenomenex)														
Eluent:	A: H ₂ O/ACN/TFA 950/50/1 V/V/V B: ACN/H ₂ O/TFA 950/50/0.85 V/V/V														
Flow:	0.50 mL/min (standard analytic method)														
Gradient:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>time [min]</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>8.1</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.1</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	time [min]	%B	0	5	8	20	8.1	90	10	90	10.1	5	16	5
time [min]	%B														
0	5														
8	20														
8.1	90														
10	90														
10.1	5														
16	5														
Wavelength:	220 nm and 258 nm														
Injection volume:	2 µL														
Software:	Dionex Chromeleon														

3.8. DATA EVALUATION

Table(s) and/or figure(s) of measured parameters presented in the report were produced using PC based tabular calculation software. The mean and individual data were not always rounded but the significant digits were produced by changing the display format. As a consequence, calculation of mean values using the individual data presented in the report will, in some instances, yield minor variations in value.

The integrated peak areas were transferred electronically into EXCEL data spreadsheets to carry out the necessary calculations.

Some test substances or reaction products may co-eluate with the peptides. In these cases where proper integration and calculation of peptide depletion was not possible, the result for the respective peptide is reported as interference.

When samples were additionally analyzed by measuring UV absorbance at 258 nm, the area ratio 220 nm/ 258 nm may be calculated and serve as a measure of peak purity. The ratio of a pure peptide peak should be consistent over all samples (100% ± 10% of the mean of the vehicle controls). However, due to small peak areas calculation of the area ratio may not be possible for all samples.

3.8.1. Calculation of the peptide concentrations

For each peptide a calibration curve was generated from the measured peak areas of the calibration samples of known peptide concentration.

The peptide concentration of the samples was calculated with the respective calibration curve using linear regression (b = axis intercept; m = slope).

$$\text{Peptide concentration [mM]} = \frac{\text{peak area [mAU} \times s] - b}{m}$$

3.8.2. Calculation of the peptide depletion

The peptide depletion of a sample was calculated as follows:

$$\text{Peptide depletion of sample} = \left[1 - \frac{\text{peptide concentration of sample (mM)}}{\text{mean peptide concentration of NC (mM)}} \right] \times 100 \quad [\%]$$

The mean peptide depletion for each of the two peptides was calculated as the mean value of the three samples conducted for each peptide and test substance (C-containing and K-containing peptide depletion; example calculation for C-containing peptide):

$$\text{C - containing peptide depletion of a test substance} [\%] = \text{mean} [\text{C - containing peptide depletion of samples 1 - 3}] [\%]$$

When a negative value for C- or K-peptide depletion was obtained the value was considered zero for calculation of the mean peptide depletion.

The mean peptide depletion of a test substance was calculated as the mean value of C-containing peptide depletion and K-containing peptide depletion:

$$\text{Mean peptide depletion [\%]} = \frac{\text{C-containing peptide depletion [\%]} + \text{K-containing peptide depletion [\%]}}{2}$$

3.9. ACCEPTANCE CRITERIA

If any of the acceptance criteria mentioned below is not met, repetition of the test is considered. In the case of an unambiguous result the study director may decide that an experiment is valid despite a deviation of acceptance criteria. However, reasonable justification must then be given.

The standard calibration curve should have an $r^2 > 0.99$.

The negative control (vehicle control) samples of sets A and C should be 0.50 mM +/- 0.05 mM.

The CV of the nine vehicle controls B and C should be < 15%.

Since the mean peptide depletion for each peptide is determined from the mean of three single samples, the variability between these samples should be acceptably low (SD <14.9% for % cysteine depletion and <11.6% for % lysine depletion).

In addition, the positive control should cause depletion of both peptides comparable to historic data.

3.10. EVALUATION OF RESULTS

3.10.1. Peptide depletion

Chemical reactivity was determined by mean peptide depletion [%] and was rated as high, moderate, low, or minimal:

Table 3: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model.

Mean peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 42.47	high reactivity	positive
> 22.62 ≤ 42.47	moderate reactivity	positive
> 8.11 ≤ 22.62	low reactivity	positive
> 4.65 ≤ 8.11	no to low reactivity	borderline ¹
≤ 4.65	minimal or no reactivity	negative

In the case mean peptide depletion [%] cannot be determined due to invalid K-peptide depletion (e.g. insolubility of the K-peptide samples or interference in the samples of the K-peptide) but valid C-peptide depletion is available, evaluation is performed as follows:

Table 4: Evaluation criteria of DPRA; Cysteine 1:10 prediction model.

C peptide depletion [%]	Reactivity	Evaluation
> 98.24	high reactivity	positive
> 23.09 ≤ 98.24	moderate reactivity	positive
> 17.28 ≤ 23.09	low reactivity	positive
> 10.50 ≤ 17.28	no to low reactivity	borderline ²
≤ 10.50	minimal or no reactivity	negative

¹ The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 6.38 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 6.38 ≤ 22.62 as “positive” (low reactivity).

² The „borderline“-evaluation was determined statistically using historic BASF data and hence considers the variance of the test method. This evaluation is an amendment to the evaluation given in OECD TG442C. OECD TG442C defines mean depletions ≤ 13.89 as “negative” (minimal or no reactivity) and mean depletions > 13.89 ≤ 23.09 as “positive” (low reactivity).

3.10.2. Limitations of the evaluation by insolubility and gravimetric procedure

For test substances that are not completely soluble by visual observation in the sample preparations containing the peptides immediately after preparation or after 24 hours, or when a gravimetric procedure is applied (with the exception of application of the undiluted test substance), the result may be under-predictive due to limited availability of the test substance. In this case mean peptide reactivity < 8.11% (Cysteine 1:10 / lysine 1:50 prediction model) or < 17.28% (Cysteine 1:10 prediction model) is interpreted as “inconclusive”. However, a mean peptide depletion > 8.11% or > 17.28% is considered as “positive”.

3.11. HISTORIC CONTROL DATA

Historic control values of negative and positive controls, gathered over an appropriate time period, are presented in section 4.6. These data demonstrate the reproducibility of results and robustness of the procedures. They are used to derive suitable acceptance criteria (see section 3.9) for the test system.

4. RESULTS

For sample chromatograms of the vehicle control, co-elution control and test-substance samples see Appendix.

4.1. CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDE

4.1.1. Cysteine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
C: Calib. 1	0.534	683.7	17.2	39.7		
C: Calib. 2	0.267	346.2	8.8	39.4	Slope:	1280.3
C: Calib. 3	0.134	173.3	n.a.	-	Axis intercept:	1.682
C: Calib. 4	0.067	88.7	n.a.	-	Correlation:	0.99997
C: Calib. 5	0.033	44.2	n.a.	-		
C: Calib. 6	0.017	21.6	n.a.	-		
C: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

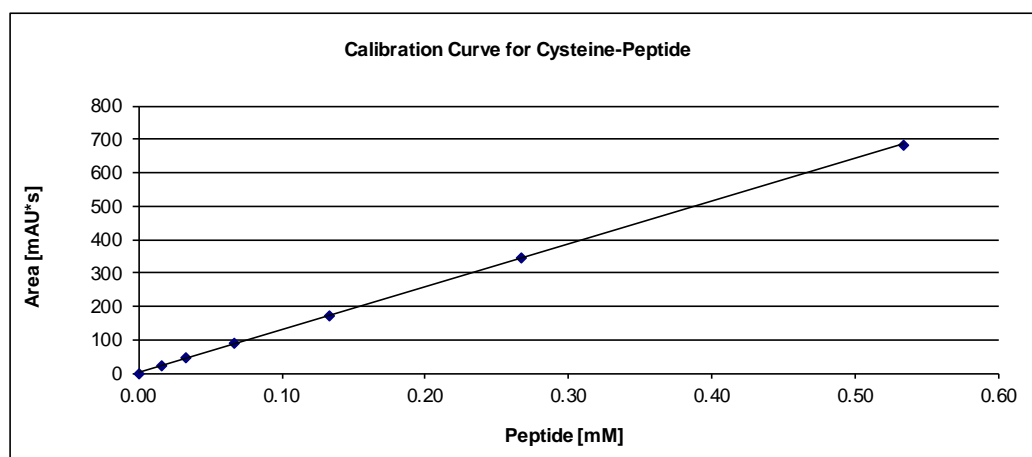


Figure 1: Calibration curve for Cysteine peptide

4.1.2. Cysteine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.493 mM with a SD of 0.002 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.492 mM with a SD of 0.001 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.497 mM with a SD of 0.003 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.7%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.1.3.

4.1.3. Reaction with cysteine-peptide

Table 5: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	627.8	628.9	632.5	0.489	0.490	0.493	0.491	0.002
Trimethylolpropan-TGE	84.0	76.3	67.2	0.064	0.058	0.051	0.058	0.007
PC: EGDMA in ACN	307.4	293.5	281.3	0.239	0.228	0.218	0.228	0.010

Reaction with cysteine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	0.30	0.13	-0.44	0.00	0.39
Trimethylolpropan-TGE	86.89	88.11	89.56	88.19	1.34
PC: EGDMA in ACN	51.32	53.54	55.48	53.45	2.08

Table 6: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with cysteine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	16.0	15.9	15.9	39.2	39.4	39.9
Trimethylolpropan-TGE	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
PC: EGDMA in ACN	7.7	7.2	6.9	39.8	40.5	40.7

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 39.8.

For the test substance calculation of an area ratio 220 nm/ 258 nm was not possible due to small peak values.

4.2. LYSINE-CONTAINING PEPTIDE

4.2.1. Lysine-peptide calibration curve

Sample	Peptide [mM]	Peak Area [mAU*s] at 220 nm	Peak Area [mAU*s] at 258 nm	area ratio 220 nm/258 nm		
K: Calib. 1	0.534	538.9	13.9	38.8		
K: Calib. 2	0.267	274.4	6.9	39.7	Slope:	1014.8
K: Calib. 3	0.134	130.2	n.a.	-	Axis intercept:	-1.538
K: Calib. 4	0.067	64.9	n.a.	-	Correlation:	0.99990
K: Calib. 5	0.033	32.7	n.a.	-		
K: Calib. 6	0.017	15.0	n.a.	-		
K: Dilution buffer	0.000	0.0	n.a.	-		

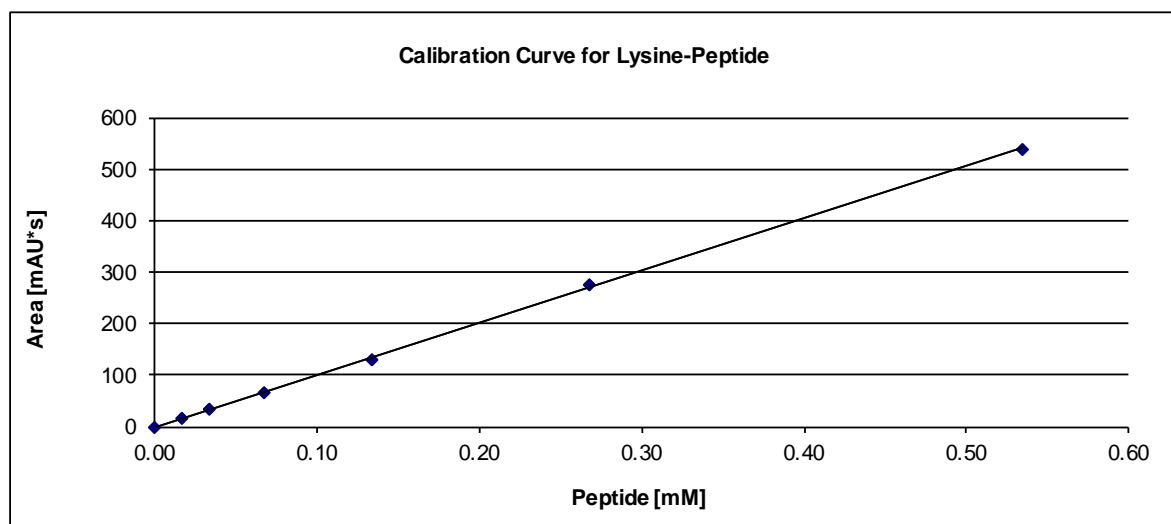


Figure 2: Calibration curve for Lysine peptide

4.2.2. Lysine-peptide vehicle controls in acetonitrile

The mean peptide concentration of the three samples of set A was calculated to be 0.506 mM with a SD of 0.002 mM, demonstrating good performance.

The mean peptide concentration of the three samples of set B, analyzed at the beginning of the sample list was calculated to be 0.518 mM with a SD of 0.002 mM. The other three samples of set B, analyzed at the end of the sample list had a mean peptide concentration of 0.525 mM with a SD of 0.005 mM.

The CV of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 0.8%. Thus the peptide was considered stable over the time of analysis.

For results of the samples of set C see section 4.2.3.

4.2.3. Reaction with lysine-peptide

Table 7: Peak area, peptide concentration and peptide depletion of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 220 nm			peptide concentration [mM]				
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	524.2	528.0	531.2	0.518	0.522	0.525	0.522	0.003
Trimethylolpropan-TGE	432.8	434.5	435.5	0.428	0.430	0.431	0.429	0.001
PC: EGDMA in ACN	458.6	455.1	453.3	0.453	0.450	0.448	0.451	0.003

Reaction with lysine-peptide	peptide depletion [%]				
	sample 1	sample 2	sample 3	mean	SD
NC: ACN	0.68	-0.04	-0.64	0.00	0.66
Trimethylolpropan-TGE	17.94	17.63	17.43	17.67	0.25
PC: EGDMA in ACN	13.08	13.73	14.08	13.63	0.51

Table 8: Area ratio 220 nm/258 nm of NC, PC and the test substance.

Reaction with lysine-peptide	peak area [mAU*s] at 258 nm			area ratio 220 nm/258 nm		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
NC: ACN	13.2	13.2	13.1	39.6	40.1	40.6
Trimethylolpropan-TGE	10.9	10.8	10.9	39.7	40.3	39.8
PC: EGDMA in ACN	11.7	11.5	11.5	39.1	39.4	39.3

The mean area ratio 220 nm/ 258 nm of the 9 vehicle control samples of sets B and C was calculated to be 40.2. Hence, the area ratio 220 nm/ 258 nm of the test substance samples correspond to 99.0% to 100.4% of the mean of the vehicle controls.

4.3. SOLUBILITY OF THE TEST-SUBSTANCE SAMPLES WITH THE PEPTIDES

The test substance was soluble in acetonitrile. The samples of the test substance with the C-peptide were solutions at the time of preparation and after 24 hours. The samples of the test substance and the K-peptide were emulsions at the time of preparation and after 24 hours.

4.4. CO-ELUTION

No co-elution of the test substance and peptides occurred as demonstrated by the consistent values of the area ratios 220 nm/258 nm (available for lysine only due to low area values of the cysteine-peaks; for values see sections 4.1.3 and 4.2.3) and chromatograms of the co-elution control in the Appendix.

4.5. MEAN PEPTIDE DEPLETION

The mean peptide depletion as average of cysteine- and lysine-peptide depletions is calculated and summarized in the table below. Due to the insolubility of the test substance in the K-peptide samples calculation of mean peptide depletion is not applicable for the test substance.

Table 9: Mean peptide depletions of Cysteine, Lysine and both peptides.

	Cysteine-Peptide		Lysine-Peptide		mean of both depletions [%]
	mean depletion [%]	SD [%]	mean depletion [%]	SD [%]	
Trimethylolpropan-TGE	88.19	1.34	17.67	0.25	-
PC: EGDMA in ACN	53.45	2.08	13.63	0.51	33.54

4.6. HISTORIC CONTROL DATA

The acceptance criteria mentioned in section 3.9 were met.

The positive control caused depletion of both peptides is comparable to historic data as can be seen in the following table:

Table 10: Historic control data of negative control / vehicle control.

Acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Mar 2016

	C-peptide concentration [mM]	K-peptide concentration [mM]
Min	0.447	0.451
Max	0.542	0.541
Mean	0.485	0.503
SD	0.016	0.014
n	53	55

Table 11: Historic control data of positive control.

EGDMA, 50 mM in acetonitrile

Historic period: Jan 2014 - Mar 2016

	C-peptide concentration [mM]	C-peptide depletion [%]	K-peptide concentration [mM]	K-peptide depletion [%]
Min	0.058	43.32	0.373	7.99
Max	0.282	88.30	0.489	25.24
Mean	0.215	55.61	0.431	14.88
SD	0.040	7.92	0.023	3.21
n		35		35

5. CONCLUSION

Based on the observed results and applying the Cysteine 1:10 prediction model cited in chapter 3.10 it was concluded that **Trimethylolpropan-TGE, CAS No.: 30499-70-8; 3454-29-3, shows a moderate chemical reactivity** in the DPRA under the test conditions chosen.

6. VALIDITY CRITERIA / REFERENCES

Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Eltze 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(3):489-504.

Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittenvin JP. (2007) Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicological Sciences* 97(2), 417-427.

OECD 2012: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins (2012) OECD ENVIRONMENT, HEALTH AND SAFETY PUBLICATIONS: No.168; ENV/JM/MONO(2012)10
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en) last accessed 05 Feb 2013.

OECD Guideline for Testing of Chemicals TG. 442C, adopted 04 February 2015 (*"In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)"*)

Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle SN, Landsiedel R, Jaworska J, Kern P, 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. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71(2), 135-352.

7. LIST OF ABBREVIATIONS

The following list contains abbreviations and definitions generally used in reports for this study type. This report will not necessarily use all expressions listed below.

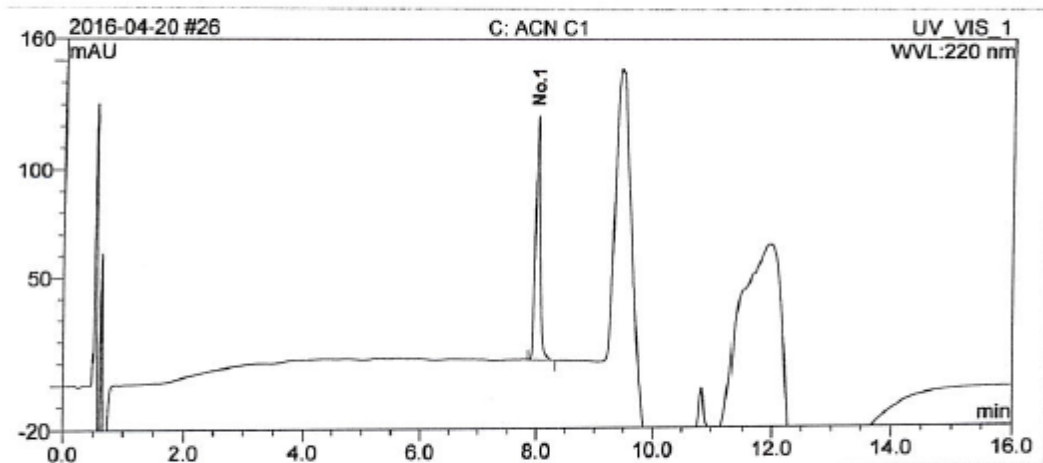
A	= alanine
AC	= acetone
Ac	= acetyl group
ACN	= acetonitrile
approx..	= approximately
C	= cysteine
ca.	= circa
Calib.	= calibration sample
cm	= centimeter
cm ²	= square centimeter
COOH	= carboxyl group
CV	= coefficient of variation
d	= day
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DTT	= dithiothreitol
EGDMA	= ethylene glycol dimethacrylate
F	= phenylalanine
G; g	= gram
h	= hour
IPA	= isopropyl alcohol (isopropanol)
K	= lysine
M	= mol / liter
mAU	= milli absorbance units
MeOH	= methanol
mg	= milligram
µg	= microgram
Min, min	= minute(s)
µL	= microliter
mL	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimol / liter
µm	= micrometer
MW	= Molecular weight

n.a.	= not assigned
NC	= negative control
No.; no.	= number
nm	= nanometer
p.a.	= per analysis
PC	= positive control
PrOH	= propanol
R	= arginine
SD	= standard deviation
SK	= co-elution control (Substanzkontrolle)
STD	= standard
TFA	= trifluoroacetic acid
UV	= ultraviolet
v/v	= volume / volume
Symbols:	
°C	= degree Celsius
~	= circa
=	= analogous
%	= per cent
∅	= diameter

APPENDIX

SAMPLE CHROMATOGRAMS

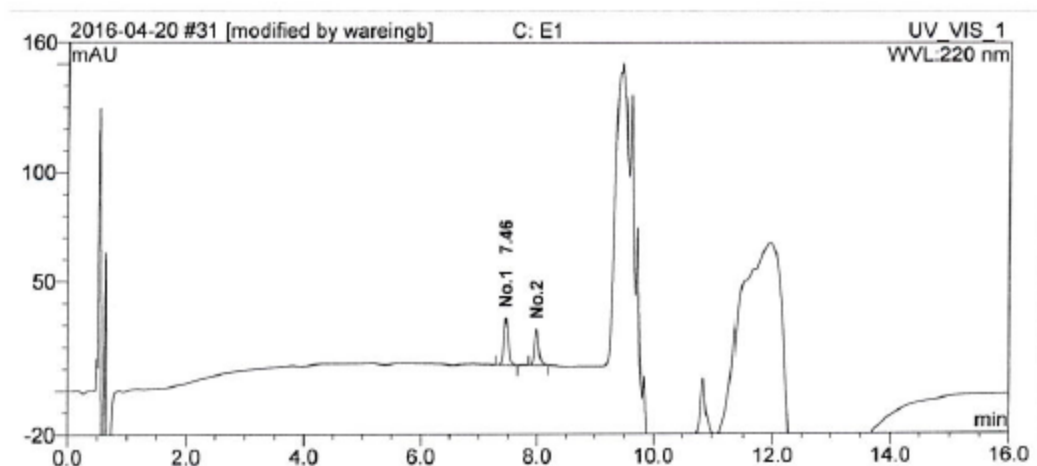
Sample Name:	C: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	GA4	Recording Time:	20/04/16 17:26
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	7.9950	627.846	113.393		100.0

Figure 3: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the C-containing peptide

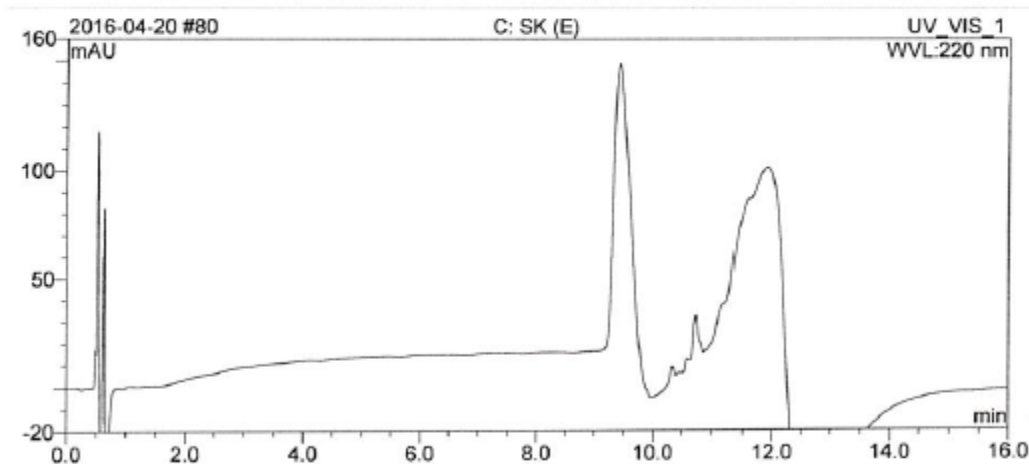
Sample Name:	C: E1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	GB1	Recording Time:	20/04/16 18:50
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	7.4592	106.641	21.437		55.9
2	7.9858	84.003	16.453	190.644	44.1

Figure 4: Test substance incubated with the C-containing peptide

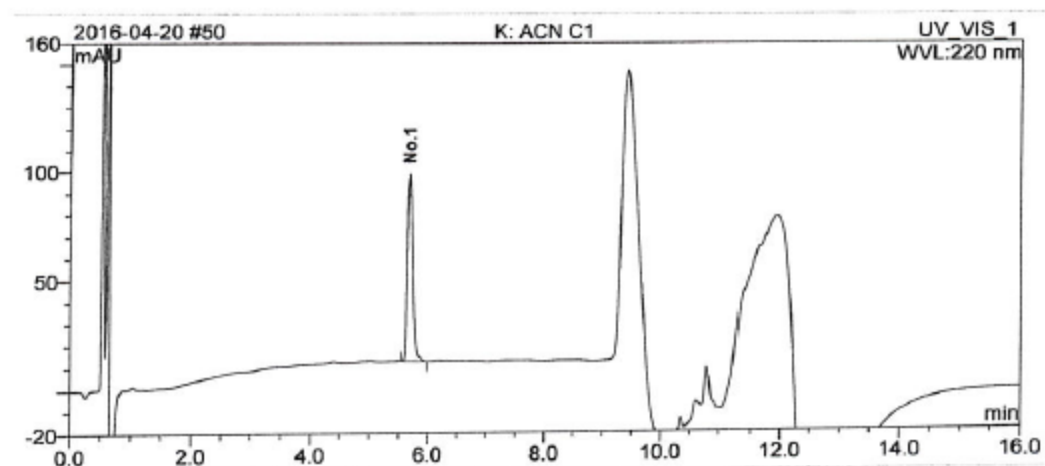
Sample Name:	C: SK (E)		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	RB3	Recording Time:	21/04/16 08:38
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
-----	--------------	------------	------------	----------------	------------

Figure 5: Co-elution control (sample in pH 7.5 phosphate buffer)

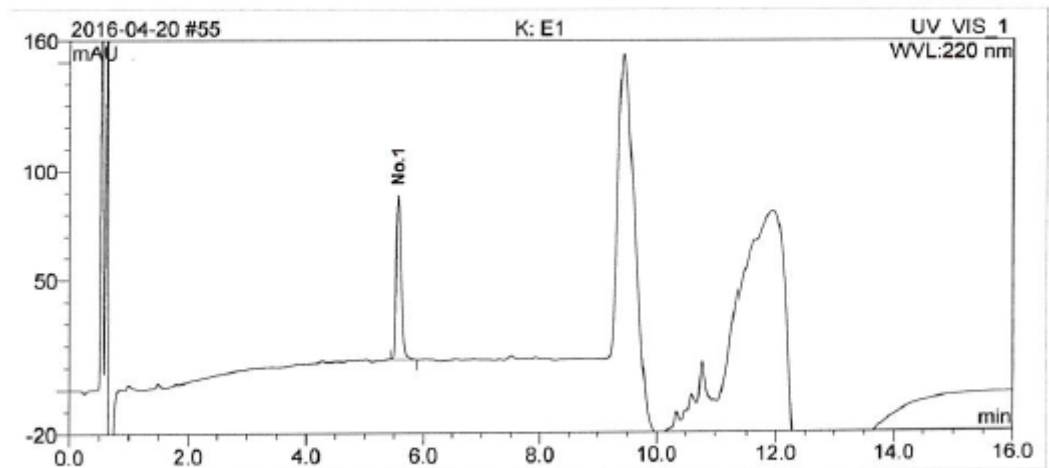
Sample Name:	K: ACN C1		
Injection Volume [µL]:	2.0		
Vial Number:	GD4	Recording Time:	21/04/16 00:11
Sample Type:	unknown	Run Time [min]:	16.00
Control Program:	DPRA Standard-Analysen	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.6800	524.201	85.946		100.0

Figure 6: Vehicle control (acetonitrile) incubated with the K-containing peptide

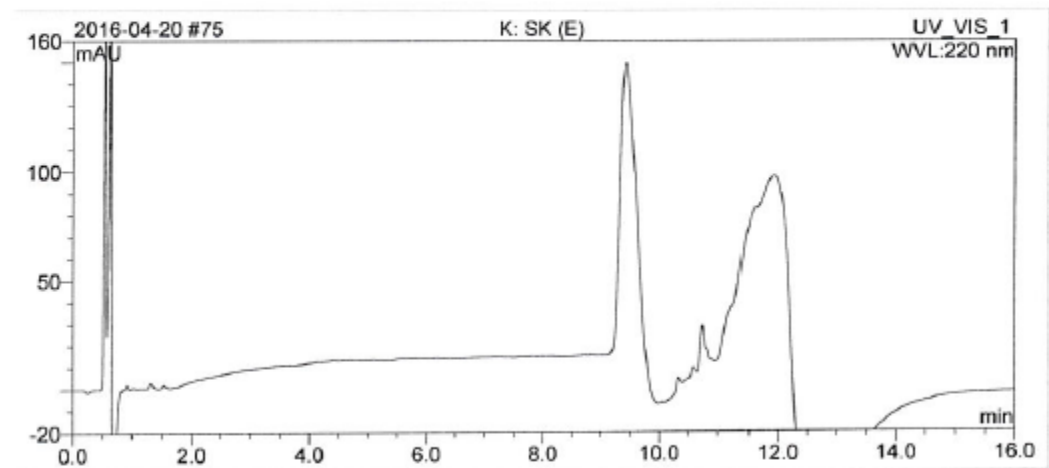
Sample Name:	K: E1		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	21/04/16 01:36
Vial Number:	GE1	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.5642	432.845	75.120		100.0

Figure 7: Test substance incubated with the K-containing peptide

Sample Name:	K: SK (E)		
Injection Volume [µL]:	2.0	Recording Time:	21/04/16 07:13
Vial Number:	RA6	Run Time [min]:	16.00
Sample Type:	unknown	Quantif. Method:	Quantifizierung 2-1
Control Program:	DPRA Standard-Analysen		



No.	Ret.Time min	Area mAU*s	Height mAU	Area Sum mAU*s	Rel.Area %
1	5.5642	432.845	75.120		100.0

Figure 8: Co-elution control (sample in pH 10.2 ammonium acetate buffer)

ANALYSES OF THE TEST SUBSTANCE

Certificate of Analysis

15/0580-1

checked
12 Apr 2016

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

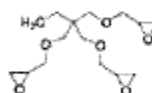
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:

Trimethylolpropane triglycidyl ether - technical grade

Product Number: 430269
 Batch Number: MKBQ5700V
 Brand: ALDRICH
 CAS Number: 3454-29-3
 MDL Number: MFCD00274208
 Formula: C15H26O6
 Formula Weight: 302.36 g/mol
 Quality Release Date: 06 NOV 2013



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless to Yellow	Colorless
Appearance (Form)	Viscous Liquid	Viscous Liquid
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Viscosity	120 - 180 cps	140 cps
Ubbelohde at 25 Degrees Celsius		
Color Test	≤ 2 APHA	1 APHA
Color Gardner		
Miscellaneous Assay	138 - 154	143
Weight per Epoxide (g/Eq)		

Jamie Gleason

Jamie Gleason, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, Wisconsin US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

**ANHANG 4 – STUDIENBERICHT DER PROJEKTSPEZIFISCHEN *IN VITRO* TESTUNG
IM KERATINOSENS™**

Givaudan

***KeratinoSens*TM test report on 20 chemicals used in epoxyresin
manufacture supplied by FoBiG**

Report

Final version 18.05.2016

Author(s): Dr. A. Natsch

Test facility *In vitro* toxicology laboratory
Givaudan Schweiz AG
Überlandstrasse 138
CH-8600
Dübendorf
Switzerland

Study Number: **RCR 153'561**

Sponsor Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Klarastraße 63
79106 Freiburg, Germany

Report Issued: 18.05.2016

Contents

Approval Section	3
Responsible Personnel	4
Summary	5
1. Introduction	6
2. Test and Reference Substances	6
3. Experimental Procedures	7
4. Results	10
5. Discussion and Conclusions	17
6. References	17
7. Figures – Average of repetitions	19
8. Data recalculated in molarity	31

List of Tables

Table 1.	Chemical specifications
Table 2.	Cytotoxicity determinations. Given is the IC50 value as the concentration in μM reducing the viability by 50% as determined by MTT assay.
Table 3.	Luciferase determinations. Given is the I_{max} values indicating maximal fold-induction over the tested range.
Table 4.	Luciferase determinations. Given is the EC1.5 value as the concentration in μM inducing the luciferase activity 1.5-fold.
Table 5.	Luciferase determinations. Given is the EC2 value as the concentration in μM inducing the luciferase activity 2-fold.
Table 6.	Luciferase determinations. Given is the EC3 value as the concentration in μM inducing the luciferase activity 3-fold.
Table 7.	Overall rating. Given is the number of positive repetitions / of the repetitions done and the overall rating.
Table 8.	Numerical results for the positive control cinnamic aldehyde.
Table 9.	The variability of the solvent controls.
Table 10.	Cytotoxicity determinations. IC50 values recalculated for molarity
Table 11.	Luciferase determinations. EC1.5 value recalculated for molarity
Table 12.	Luciferase determinations. EC2 recalculated for molarity
Table 13.	Luciferase determinations. EC3 recalculated for molarity

List of Figures

- Figure 1 - 20: Dose response curves of test chemicals
- Figure 21 - 23: Dose response curves of positive control
- Figure 24. Historical results for luciferase induction by the positive control in the test laboratory

Approval Section

KeratinoSensTM test on 20 chemicals supplied by FoBiG

Dr. Andreas Natsch attests to the content of the report and personally supervised the experimental proceedings of the study.

The study was conducted in the Department of Bioscience - *in vitro* Toxicology at Givaudan Schweiz AG, Dübendorf, Switzerland, between 29.2. and 10.3.2016

The study described in this report has been correctly reported and was conducted in compliance with: ECVAM. (2014), DB-ALM protocol 155: KeratinoSensTM protocol [1] and OECD test guideline 442d..

The sponsor is responsible for all test substance information.

Analysis of stability, homogeneity and concentration of the test substance under test conditions was not performed as part of this study.

Study Director:

Signature: _____

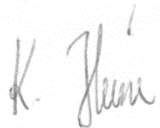


Date: 18.05.2016

Dr. Andreas Natsch
Givaudan Schweiz AG

Sponsor:

Signature: _____



Date: 19.05.2016

Dr. Karin Heine
Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH

Responsible Personnel

Study Management:

Dr. Andreas Natsch
Senior Research Fellow
Department of Bioscience-Biochemistry and *in vitro* toxicology

Contributing scientists:

Dr. Roger Emter
Research Scientist
Department of Bioscience-Biochemistry and *in vitro* toxicology

Archive statement

All primary data are recorded and permanently archived within the Givaudan electronic laboratory notebook. The data of this study are stored under experiment number GLN-00775-091.

Summary

Introduction

The KeratinoSens™ assay is a cell-based assay with a reporter cell line to detect potential skin sensitizers by their ability to induce the Nrf2-response.

This assay has been validated for a broad range of low-molecular weight chemicals and it was found to respond to skin sensitizers from a broad range of so called mechanistic applicability domains, i.e. chemicals reacting with proteins by different, but not all mechanisms.

According to the ECVAM recommendation, this assay should be used as a building block of an integrated testing strategy and not as stand-alone assay.

Experimental

Test chemicals were dissolved in DMSO and tested according to the standard operating procedure of the KeratinoSens™ assay at 12 concentrations in three repetitions, each time in three replicates. After 48 h incubation time, luciferase induction and cellular viability at each of the concentrations were determined.

Results

Ten chemicals are predicted skin sensitizers while 10 chemicals are negative according to the prediction model. For 17 chemicals all the three repetitions gave congruent results, while for 3 chemicals the prediction is derived from 2 of 3 congruent repetitions, as defined in the prediction model.

1. Introduction

The Cosmetic directive has phased out animal testing for new products. This has led to the development of potential alternative assays to screen for sensitizing potential. The KeratinoSens™ assay is a cell-based assay with a reporter cell line to detect potential skin sensitizers by their ability to induce the Nrf2-response[2].

This assay has been validated for a broad range of low-molecular weight chemicals [2-5] and it was found to respond to skin sensitizers from a broad range of so mechanistic called applicability domains, i.e. chemicals reacting with proteins by different but not all mechanisms. The assay was validated by the European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) [6] and it was included into a new OECD guideline (442d) [7].

According to the ECVAM recommendation, this assay should be used as a building block of an integrated testing strategy and not as stand-alone assay.

2. Test and Reference Substances

2.1. Test substance specification and solubility in vehicles

Table 1 lists the chemical specifications and their solubilisation into stock solutions.

All chemicals were soluble at 200 mM or 4% in DMSO, the preferred solvent of the SOP. They were serially diluted in DMSO and added to test medium as described in the SOP.

The epoxides were all dissolved at 200 mM, while all the reactive diluants / amines were dissolved at 4%. This would be equal to 200 mM for a molecule with molecular weight of 200. Since this group contained a chemical with no defined molecular weight, this approach was chosen in agreement with the study sponsor to have a direct comparison of all chemicals tested in a weight per volume ratio.

2.2. Positive reference compound

In each test Cinnamic aldehyde was included as positive control.

- MW 132.16
- CAS-Nr. 104-55-2
- Purity > 99%
- Source: Aldrich
- Order number: 239968

2.4 . Test reagents

All test reagents were sourced as indicated in the standard operating procedure

Table 1. Test chemicals and stock solutions prepared.

	CAS Nr.	Purity	Molecular weight	Solubilized in	Conc. of stock solution
Ethylendiamin (EDA)	107-15-3	Absolute (puriss p.a.)	60.1	DMSO	4 %
Diethylentriamin (DETA)	111-40-0	99%	103.2	DMSO	4 %
Dipropylentriamin	56-18-8	98%	131.22	DMSO	4 %
Trimethylhexamethylendiamin (TMD)	25513-64-8	> 99%	158.3	DMSO	4 %
Triethylentetramin	112-24-3	100%	146.23	DMSO	4 %
N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan	109-55-7	99%	102.2	DMSO	4 %
Tetraethylenpentamin	112-57-2	Technical grade*	189.3	DMSO	4 %
N-Aminoethyl-piperazin (AEP)	140-31-8	99%	129.2	DMSO	4 %
N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin (CeTePox 0214 H)	93941-62-9	Technical grade**	211.3	DMSO	4 %
m-Xylylendiamin /Acrylonitril Adduct	90530-16-8 (or 73050-11-0)	Technical grade (considered as 100%)	378.5 (SDS Sigma, 189.3 (Chemical Book)	DMSO	4 %
1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	2997-01-5	98 %	176.3	DMSO	4 %
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	90-72-2	>95%	265.4	DMSO	4 %
4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM)	1761-71-3	> 99%	210.4	DMSO	4 %
Isophorondiamin (IPD)	2855-13-2	> 99%	170.3	DMSO	4 %
N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	1760-24-3	97%	222.4	DMSO	4 %
Oligomerisierter Härter	38294-64-3	Technical grade	not applicable	DMSO	4 %
Butyl-GE	2426-08-6	95%	130.18	DMSO	200mM
2-Ethylhexyl-GE	2461-15-6	98%	186.29	DMSO	200mM
Phenyl-GE	122-60-1	99%	150.17	DMSO	200mM
o-Kreslyglycidylether	2210-79-9	Technical grade (90%)	164.2	DMSO	200mM

* 30-60% Tetraethylenpentamin and also contains 60-100% CAS 90640-66-7

** 50-100% CAS 90530-20-4 and 10-25% CAS 25513-64-8

3. Experimental Procedures

The test was run according to the final SOP published by ECVAM [1].

BASIS OF THE METHOD

The only feature all skin sensitizers have in common is their intrinsic electrophilicity or their potential to be metabolically transformed to electrophilic chemicals. The signalling pathway with the repressor protein Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) and the transcription factor Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), which binds to the antioxidant / electrophile response element (ARE / EpRE), is known to respond to electrophilic chemicals and it was found to be a valuable cellular

endpoint to detect skin sensitizers *in vitro* [8]. This result was confirmed by independent laboratories [9-13].

EXPERIMENTAL DESCRIPTION

Test System(s):

The KeratinoSens cell line was originally derived from the human keratinocyte culture HaCaT. It contains a stable insertion of a Luciferase gene under the control of the ARE-element of the gene AKR1C2 [2].

Endpoint & Endpoint Detection:

Two endpoints are measured: (i) Luciferase induction after a 48 h treatment with test chemicals and (ii) cytotoxicity as determined with the MTT assay recorded in a parallel plate with the same cell batch and made up with the same dilutions of the test chemicals.

Endpoint Value:

For Luciferase induction the maximal fold-induction over solvent control (I_{\max}) and the concentration needed to reach an 1.5 fold induction (EC1.5) are calculated. For cytotoxicity the IC50 value is extrapolated.

Basic Procedure:

Cells are grown for 24 h in 96-well plates. The medium is then replaced with medium containing a final level of 1% of the solvent DMSO containing the test chemical. Each compound is tested at 12 concentrations in the range from 0.98 to 2000 μM . Each test plate contains six wells with the solvent control, 1 well with no cells for background value and 5 wells with a dose response of the positive control cinnamic aldehyde. In each repetition, three parallel replicate plates are run with this same set-up, and a fourth parallel plate is prepared for cytotoxicity determination.

Positive control

In each test Cinnamic aldehyde is included as positive control. It is tested in each test plate at five concentrations from 4 – 64 μM .

Data Processing

Data evaluation is automatically performed by a standardized Excel template which forms part of the SOP. The test plates are read by a plate reader, and the generated raw data are directly pasted into this template, and all data processing is performed automatically by this Excel sheet.

For both the MTT and the luciferase data, first the background value recorded in an empty well without added cells is subtracted.

For the MTT data the % viability is then calculated for each well in the test plate in relation to average of the six solvent control wells.

For the luciferase data the average value of the six solvent control wells is set to 1, and for each well in the test plate the fold induction is calculated in relation to this value.

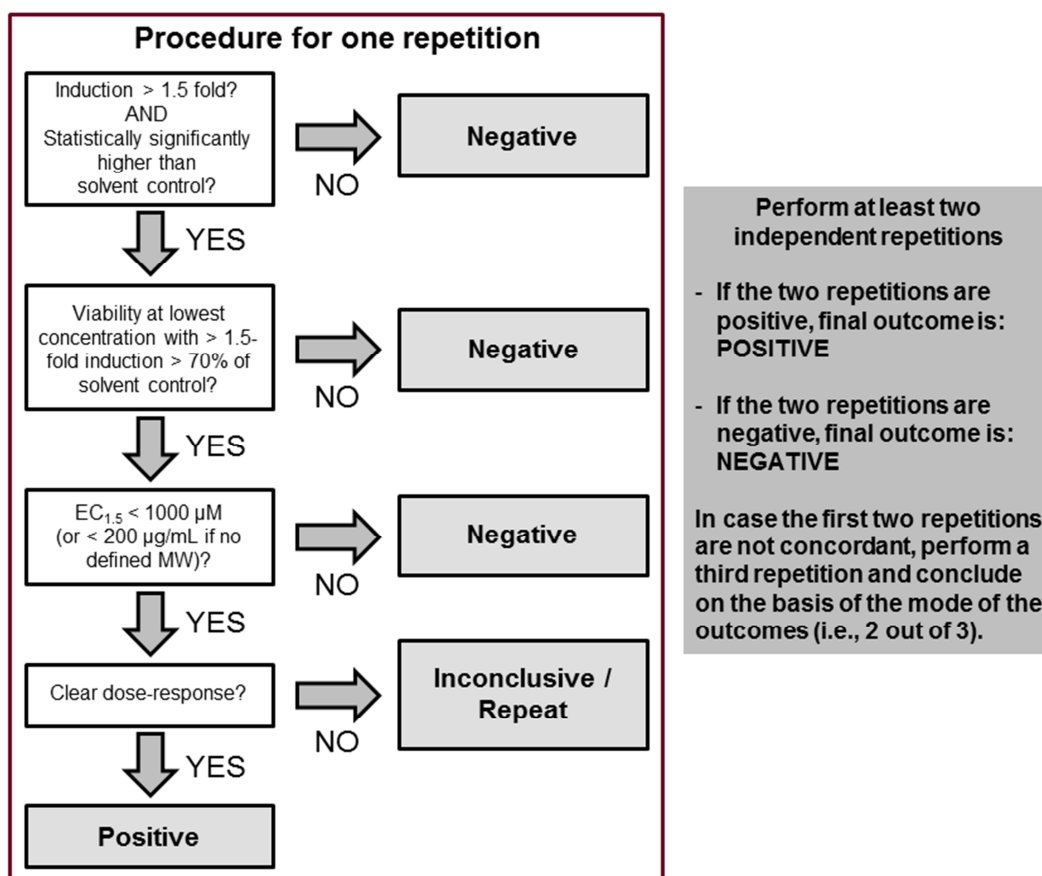
The following parameters are then calculated from these processed raw data:

- I_{\max} Maximal fold-gene induction of the luciferase gene over the full dose-response up to 1000 μM
- EC 1.5, EC2, EC3 Concentration in μM for 1.5 / 2 / 3-fold gene induction
- Pos / Neg Rating of chemical according to prediction model
- reps. Positive number of independent repetitions positive / number of repetitions done
- IC50 Concentration in μM for 50% reduction of cell viability
- IC30 Concentration in μM for 30% reduction of cell viability

Prediction Model

Chemicals are rated positive if the following conditions are met (see also Scheme 1):

- The I_{max} indicates > 1.5-fold gene induction, and this induction is statistically significant above the solvent control in a particular repetition as determined by students T-test. The EC1.5 value is below 1000 μM in all three repetitions or in at least 2 repetitions. (If the I_{max} is exactly equal to 1.5, the chemical is still rated negative and no EC1.5 value is calculated by the evaluation sheet.)
- At the lowest concentration with a gene induction above 1.5-fold (i.e. at the EC 1.5 determining value), the cellular viability is above 70%.
- There is an apparent overall dose-response for luciferase induction, which is similar between the repetitions.



Scheme 1: Prediction model of the KeratinoSens assay

4. Results

4.1 Cytotoxic activity of the test items evaluated by the MTT assay

Table 2 lists the IC₅₀ values determined by the MTT test for the test items. The full dose response curve can be seen in the Figures section (Figures 1 – 20) at the end of the report. For chemicals tested based on weight per volume, data were also recalculated in molarity and added to Table 10.

Most amines had a relatively low cytotoxicity, with the exception of the tetraethylenepentamine, which led to a gradual loss of viability over a broad concentration range and the sample 'oligomerisierter Härter', which is a very cytotoxic material when tested on these monolayer cells.

Table 2. Cytotoxicity determinations. Given is the IC₅₀ value as the concentration in ppm or µM reducing the viability by 50% as determined with the MTT assay.

	Rep 1 IC ₅₀ (ppm)	Rep 2 IC ₅₀ (ppm)	Rep 3 IC ₅₀ (ppm)	Geometric Mean IC 50 (ppm)
Ethylendiamin (EDA)	96.89	92.00	87.65	92.10
Diethylentriamin (DETA)	293.26	359.46	>400	324.68
Dipropylentriamin	>400	367.82	>400	>400
Trimethylhexamethylendiamin (TMD)	201.03	120.95	156.93	156.26
Triethylentetramin	263.08	279.00	>400	270.92
N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan	159.84	137.55	136.34	144.19
Tetraethylenpentamin	1.94	5.84	48.59	8.20
N-Aminoethyl-piperazin (AEP)	293.51	297.43	285.48	292.10
N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin	198.41	206.84	174.99	192.93
m-Xylylendiamin /Acrylonitril Adduct	>400	>400	>400	>400
1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	>400	>400	>400	>400
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	346.65	182.62	268.26	257.04
4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM)	68.84	46.84	70.52	61.04
Isophorondiamin (IPD)	118.16	56.78	111.72	90.84
N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	>400	>400	>400	>400
Oligomerisierter Härter	3.11	4.00	2.42	3.11
	Rep 1 IC ₅₀ (µM)	Rep 2 IC ₅₀ (µM)	Rep 3 IC ₅₀ (µM)	Geometric Mean IC 50 (µM)
Butyl-GE	718.48	559.44	535.24	599.20
2-Ethylhexyl-GE	372.60	229.24	194.16	255.02
Phenyl-GE	216.71	176.23	171.22	187.00
o-Kreslyglycidylether	203.50	124.54	136.26	151.15

4.2 Luciferase induction by the test items

Table 3 lists the results of luciferase determinations as expressed as the I_{max} values indicating maximal induction over the tested range up to a concentration of 1000 μ M. Table 4 lists the EC1.5 values for the test items, while Tables 5 and 6 report EC2 and EC3 values. The full dose response curves can be seen in the Figures section at the end of the report (Figures 1 – 20). For chemicals tested based on weight per volume, data were also recalculated in molarity and added to Tables 11-13.

Six of the amines and all of the epoxides induced the luciferase activity above the threshold of 1.5-fold.

Table 3. Luciferase determinations. Given is the I_{max} values indicating maximal fold-induction up to a concentration of 1000 μ M.

	Rep 1 I_{max}	Rep 2 I_{max}	Rep 3 I_{max}	Average I_{max}
Ethylendiamin (EDA)	4.93	3.68	5.48	4.70
Diethylentriamin (DETA)	1.11	1.39	1.15	1.22
Dipropylentriamin	1.61	1.86	1.55	1.67
Trimethylhexamethylendiamin (TMD)	1.06	1.49	1.21	1.25
Triethylentetramin	1.27	1.53	1.34	1.38
N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan	1.29	1.38	1.47	1.38
Tetraethylenpentamin	1.14	0.96	1.08	1.06
N-Aminoethyl-piperazin (AEP)	1.91	2.13	2.00	2.01
N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin	2.53	1.88	2.61	2.34
m-Xylylendiamin /Acrylonitril Adduct	1.12	1.13	1.06	1.11
1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	1.89	1.55	1.55	1.66
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	1.17	1.22	1.26	1.21
4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM)	1.11	1.09	0.98	1.06
Isophorondiamin (IPD)	8.91	13.56	19.02	13.83
N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	1.31	1.18	1.45	1.31
Oligomerisierter Härter	0.94	1.02	0.87	0.94
Butyl-GE	53.81	43.92	81.60	59.77
2-Ethylhexyl-GE	3.49	3.14	5.16	3.93
Phenyl-GE	53.22	61.09	68.36	60.89
o-Kreslyglycidylether	27.08	24.77	34.40	28.75

Table 4. Luciferase determinations. Given is the EC1.5 value as the concentration in ppm or µM inducing the luciferase activity 1.5-fold up to a concentration of 1000 µM.

	Rep 1 EC1.5 (ppm)	Rep 2 EC1.5 (ppm)	Rep 3 EC1.5 (ppm)	Geometric Mean EC1.5 (ppm)
Ethylendiamin (EDA)	27.14	31.35	29.83	29.39
Diethylentriamin (DETA)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Dipropylentriamin	154.89	7.69	85.51	46.71
Trimethylhexamethylendiamin (TMD)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Triethylentetramin	n.i.	5.48	n.i.	n.i.
N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Tetraethylenpentamin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
N-Aminoethyl-piperazin (AEP)	29.97	7.21	19.18	16.06
N-cyanethylertes Trimethylhexamethylendiamin	82.13	121.08	67.53	87.57
m-Xylylendiamin /Acrylonitril Adduct	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	20.86	5.81	97.52	22.78
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Isophorondiamin (IPD)	14.96	14.07	13.05	14.01
N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Oligomerisierter Härter	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	Rep 1 EC1.5 (µM)	Rep 2 EC1.5 (µM)	Rep 3 EC1.5 (µM)	Geometric Mean EC1.5 (µM)
Butyl-GE	49.24	37.36	63.51	48.89
2-Ethylhexyl-GE	30.56	22.32	35.07	28.81
Phenyl-GE	20.38	10.69	19.17	16.10
o-Kreslyglycidylether	15.50	13.57	17.33	15.39

n.i. = no induction above threshold

Table 5. Luciferase determinations. Given is the EC2 value as the concentration in μM inducing the luciferase activity 2-fold up to a concentration of 1000 μM .

	Rep 1 EC2 (ppm)	Rep 2 EC2 (ppm)	Rep 3 EC2 (ppm)	Geometric Mean EC2 (ppm)
Ethylendiamin (EDA)	33.69	52.13	39.92	41.24
Diethylentriamin (DETA)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Dipropylentriamin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Trimethylhexamethylendiamin (TMD)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Triethylentetramin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Tetraethylenpentamin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
N-Aminoethyl-piperazin (AEP)	n.i.	62.51	n.i.	n.i.
N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin	134.76	n.i.	92.91	111.89
m-Xylylendiamin /Acrylonitril Adduct	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Isophorondiamin (IPD)	19.67	16.64	15.27	17.10
N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Oligomerisierter Härter	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	Rep 1 EC2 (μM)	Rep 2 EC2 (μM)	Rep 3 EC2 (μM)	Geometric Mean EC2 (μM)
Butyl-GE	89.01	84.39	99.05	90.61
2-Ethylhexyl-GE	69.73	80.79	97.29	81.84
Phenyl-GE	33.01	20.57	32.72	28.11
o-Kreslyglycidylether	30.90	25.85	33.29	29.85

n.i. = no induction above threshold

Table 6. Luciferase determinations. Given is the EC3 value as the concentration in μM inducing the luciferase activity 3-fold up to a concentration of 1000 μM .

	Rep 1 EC3 (ppm)	Rep 2 EC3 (ppm)	Rep 3 EC3 (ppm)	Geometric Mean EC3 (ppm)
Ethylendiamin (EDA)	46.79	80.56	58.40	60.38
Diethylentriamin (DETA)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Dipropylentriamin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Trimethylhexamethylendiamin (TMD)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Triethylentetramin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Tetraethylenpentamin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
N-Aminoethyl-piperazin (AEP)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
m-Xylylendiamin /Acrylonitril Adduct	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Isophorondiamin (IPD)	26.71	21.77	19.71	22.55
N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Oligomerisierter Härter	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	Rep 1 EC3 (μM)	Rep 2 EC3 (μM)	Rep 3 EC3 (μM)	Geometric Mean EC3 (μM)
Butyl-GE	155.72	155.19	147.36	152.71
2-Ethylhexyl-GE	195.15	228.38	157.77	191.58
Phenyl-GE	46.90	34.95	48.26	42.92
o-Kreslyglycidylether	50.41	39.66	51.19	46.78

n.i. = no induction above threshold

Table 7 lists the rating of the individual repetitions and the overall rating.

Ten chemicals are predicted skin sensitizers while 10 chemicals are negative according to the prediction model. For 17 chemicals all the three repetitions gave congruent results, while for 3 chemicals the prediction is derived from 2 of 3 congruent repetitions, as defined in the prediction model.

Table 7. Overall rating of the test items according to the prediction model and the number of positive repetitions.

	Repetitions positive	Overall rating
Ethylendiamin (EDA)	3 of 3	pos
Diethylentriamin (DETA)	0 of 3	neg
Dipropylentriamin	3 of 3	pos
Trimethylhexamethylendiamin (TMD)	0 of 3	neg
Triethylentetramin	1 of 3	neg
N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan	0 of 3	neg
Tetraethylenpentamin	0 of 3	neg
N-Aminoethyl-piperazin (AEP)	3 of 3	pos
N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin	2 of 3	pos
m-Xylylendiamin /Acrylonitril Adduct	0 of 3	neg
1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	3 of 3	pos
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	0 of 3	neg
4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM)	0 of 3	neg
Isophorondiamin (IPD)	2 of 3	pos
N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	0 of 3	neg
Oligomerisierter Härter	0 of 3	neg
Butyl-GE	3 of 3	pos
2-Ethylhexyl-GE	3 of 3	pos
Phenyl-GE	3 of 3	pos
o-Kreslyglycidylether	3 of 3	pos

4.3. Positive and negative control

Cinnamic aldehyde was run in all three repetitions and in all three masterplates used in the study. Chemicals 1 – 7 were run in masterplate 1, 8 – 14 in masterplate 2, and 15 - 20 in masterplate 3.

Here the detailed results for this positive control are reported in Table 8a – 8c. Cinnamic aldehyde needs to be positive for a run to be accepted (i.e. induction > 1.5 fold). This was the case in all three repetitions and in all three masterplates.

The induction at 64 μM and the EC 1.5 for cinnamic aldehyde were also calculated. The targets are: (i) Average induction in the three replicates for cinnamic aldehyde at 64 μM should be between 2 and 8, and (ii) the EC 1.5 value should be between 7 μM and 30 μM . At least one of these two numerical criteria must be met in order to accept a repetition. In the experiments performed here both criteria were fulfilled in all three repetitions in masterplates 1. In Masterplate 2, the criteria for induction at 64 μM was fulfilled in all three repetitions, while the EC1.5 was below the target band in two repetitions (6.3 μM and hence close to target of 7 μM). In Masterplate 3, the criteria for induction at 64 μM was fulfilled in all three repetitions, while the EC1.5 was below the target band in one repetitions (6.14 μM and hence close to target of 7 μM).

Thus, the minimal criteria defined in the SOP were fulfilled in all three repetitions in all three masterplates, and all experiments were valid for the positive control. This is also nicely demonstrated by the consistent dose response curves for the positive control shown in Figures 21-23 which are in agreement with historical results (Figure 24). As second performance criterion the variability of the solvent control must be below 20%. Tables 9a – 9c list the results of the three repetitions. All three repetitions were valid for the solvent control.

Table 8a. Numerical results for the positive control cinnamic aldehyde. Masterplate 1.

Quality control: Induction values Reference						Criteria		
cinnamic aldehyde	4 μ M	8 μ M	16 μ M	32 μ M	64 μ M	EC 1.5	EC 1.5	Ind. 64 μ M
rep1	1.21	1.31	1.62	1.98	3.16	12.91	TRUE	TRUE
rep2	1.20	1.23	1.39	1.66	2.41	22.28	TRUE	TRUE
rep3	1.28	1.51	1.66	2.31	5.08	7.86	TRUE	TRUE
Average	1.23	1.35	1.56	1.98	3.55	14.35		

Table 8b. Numerical results for the positive control cinnamic aldehyde. Masterplate 2.

Quality control: Induction values Reference						Criteria		
cinnamic aldehyde	4 μ M	8 μ M	16 μ M	32 μ M	64 μ M	EC 1.5	EC 1.5	Ind. 64 μ M
rep1	1.28	1.66	1.56	2.21	3.78	6.31	FALSE	TRUE
rep2	1.26	1.34	1.52	1.95	3.04	15.04	TRUE	TRUE
rep3	1.33	1.62	1.91	2.60	4.49	6.36	FALSE	TRUE
Average	1.29	1.54	1.66	2.25	3.77	9.24		

Table 8c. Numerical results for the positive control cinnamic aldehyde. Masterplate 3.

Quality control: Induction values Reference						Criteria		
cinnamic aldehyde	4 μ M	8 μ M	16 μ M	32 μ M	64 μ M	EC 1.5	EC 1.5	Ind. 64 μ M
rep1	1.34	1.50	1.72	2.29	3.46	8.05	TRUE	TRUE
rep2	1.23	1.38	1.79	2.03	3.41	10.34	TRUE	TRUE
rep3	1.33	1.64	1.77	2.52	4.56	6.16	FALSE	TRUE
Average	1.30	1.51	1.76	2.28	3.81	8.18		

Table 9a. The variability of the solvent controls. Masterplate 1.

	% standard deviation blanks	
rep1	13.31	ACCEPTED
rep2	15.94	ACCEPTED
rep3	10.01	ACCEPTED

Table 9b. The variability of the solvent controls. Masterplate 2.

	% standard deviation blanks	
rep1	11.45	ACCEPTED
rep2	16.34	ACCEPTED
rep3	17.65	ACCEPTED

Table 9c. The variability of the solvent controls. Masterplate 3.

	% standard deviation blanks	
rep1	15.04	ACCEPTED
rep2	10.79	ACCEPTED
rep3	13.66	ACCEPTED

5. Discussion and Conclusions

All chemicals could be tested based on their solubility and physicochemical characteristics. Results between repetitions were consistent with overall low variability.

The result of the KeratinoSens™ assay should be used as part of an integrated approach for testing and assessment (IATA)[6]. A parallel test in the DPRA may indicate whether congruent results are obtained by both test methods. According to a detailed analysis on large set of substances, two congruent results in these two tests give a good prediction of the sensitizer hazard [14-16], in particular when comparing against human data, while an additional test in a dendritic cell line assessing expression of surface markers may be needed in case of discordant results.

All epoxides / glycidyl-ethers were strongly positive, while mixed results were obtained for the different amines. Some are clearly positive, while some of the longer poly-amines like diethylenetriamine, trimethyl-hexamethylenediamine or triethylenetetraamine are negative.

6. References

1. ECVAM, *KeratinoSens™ protocol*. DB-ALM database, 2014. **Protocol 155**: p. <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/index.cfm?idmm=6>, Last accessed 3.2.2014.
2. Emter, R., G. Ellis, and A. Natsch, *Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010. **245**: p. 281-290.
3. Natsch, A., et al., *The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories*. *Toxicol. In Vitro*, 2011. **25**(3): p. 733-44.
4. Ball, N., et al., *Evaluating the sensitization potential of surfactants: Integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach*. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2011. **60**: p. 389-400.
5. Delaine, T., et al., *Structure-Activity Relationship between the in Vivo Skin Sensitizing Potency of Analogues of Phenyl Glycidyl Ether and the Induction of Nrf2-Dependent Luciferase Activity in the KeratinoSens in Vitro Assay*. *Chem. Res. Toxicol.*, 2011. **24**(8): p. 1312-8.
6. ECVAM, *EURL ECVAM Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing* http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation, last accessed 26.3.2014, 2014.
7. OECD, *OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method*. OECD testing guidelines, 2015. **442d**.
8. Natsch, A., *The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers--functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers*. *Toxicol. Sci.*, 2010. **113**(2): p. 284-92.
9. Ade, N., et al., *HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: Role of the Keap1/Nrf2 pathway*. *Toxicol. Sci.*, 2009. **107**(2): p. 451-460.
10. van der Veen, J.W., et al., *Applicability of a keratinocyte gene signature to predict skin sensitizing potential*. *Toxicol. In Vitro*, 2013. **27**(1): p. 314-22.
11. Vandebriel, R.J., et al., *Keratinocyte gene expression profiles discriminate sensitizing and irritating compounds*. *Toxicol. Sci.*, 2010. **117**(1): p. 81-9.
12. Johansson, H., et al., *A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests*. *BMC Genomics*, 2011. **12**(1): p. 399.
13. Miyazawa, M. and A. Takashima, *Development and validation of a new in vitro assay designed to measure contact allergen-triggered oxidative stress in dendritic cells*. *J. Dermatol. Sci.*, 2012. **68**(2): p. 73-81.

14. Natsch, A., et al., *A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation*. J Appl Toxicol, 2013. **33**(11): p. 1337-52.
15. Urbisch, D., et al., *Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods*. Regul. Toxicol. Pharmacol., 2015. **71**(2): p. 337-51.
16. Bauch, C., et al., *Putting the parts together: Combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials*. Regul Toxicol Pharmacol, 2012. **63**(3): p. 489-504.

7. Figures – Average of repetitions

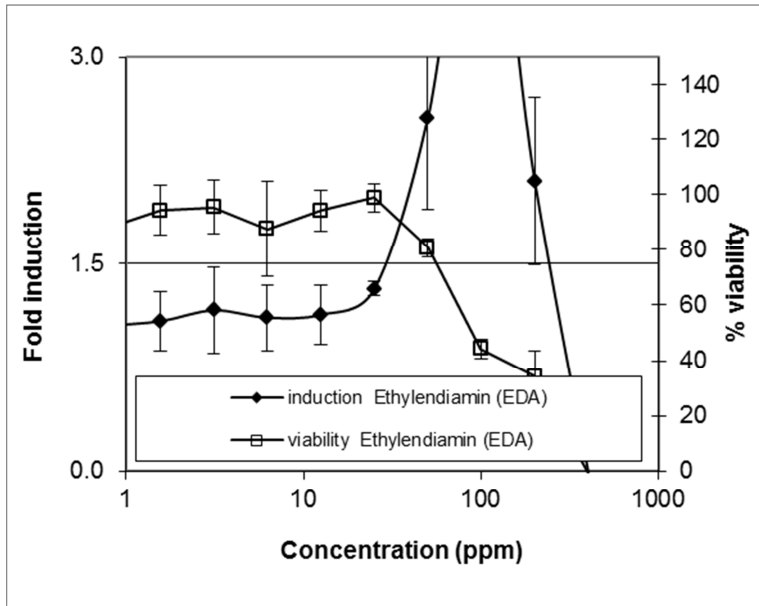


Figure 1. Dose response curves for Ethylenediamin (EDA). Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares). See detailed results for this chemical in Figure 19 and discussion in the results section.

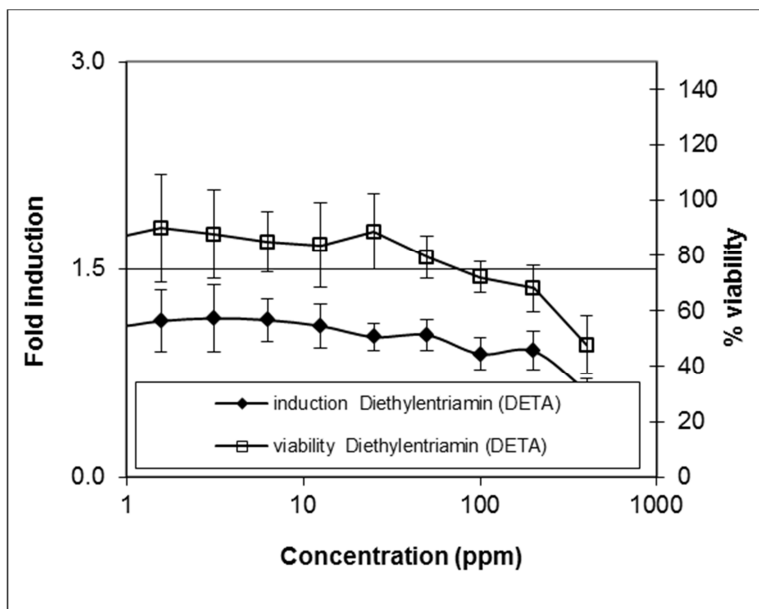


Figure 2. Dose response curves for Diethylenetriamin (DETA). Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

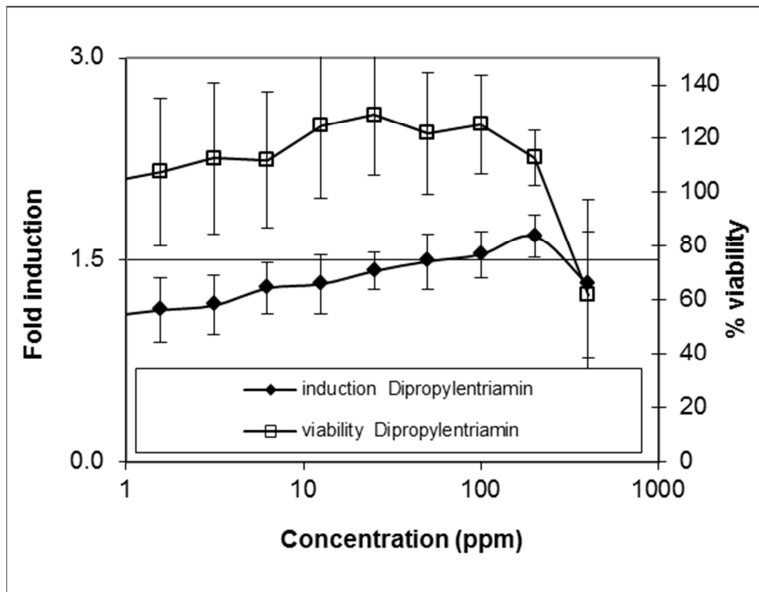


Figure 3. Dose response curves for Dipropylentriamin. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

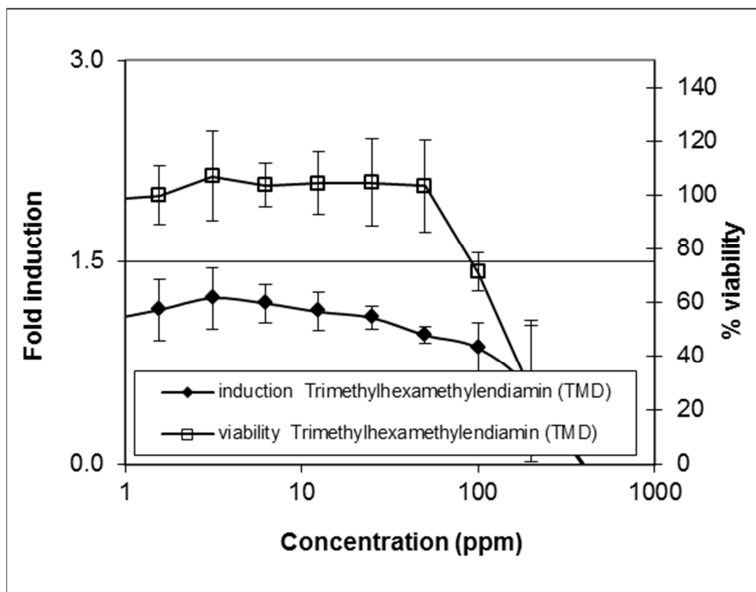


Figure 4 Dose response curves for Trimethylhexamethylendiamin (TMD). Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

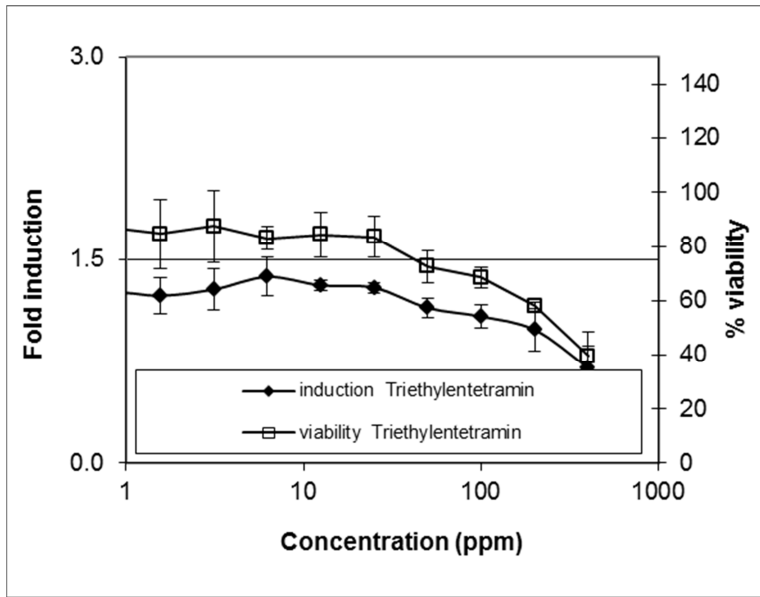


Figure 5. Dose response curves for Triethylentetramin. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

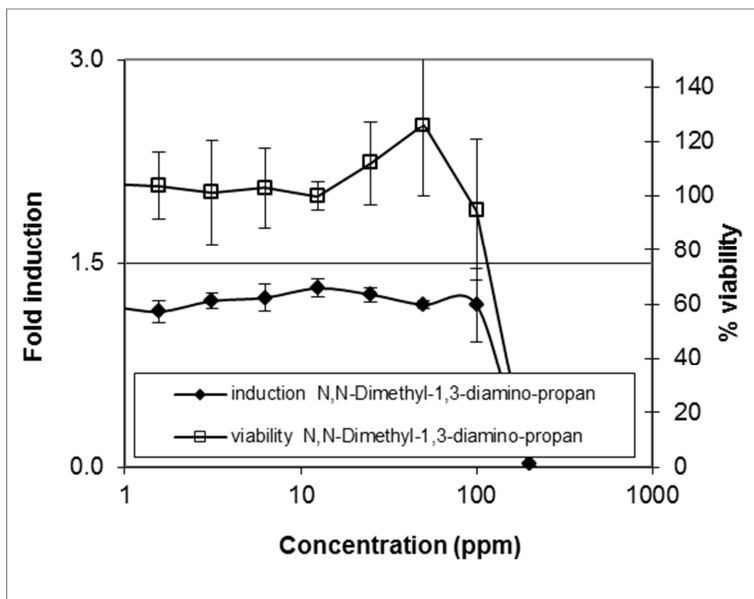


Figure 6. Dose response curves for N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

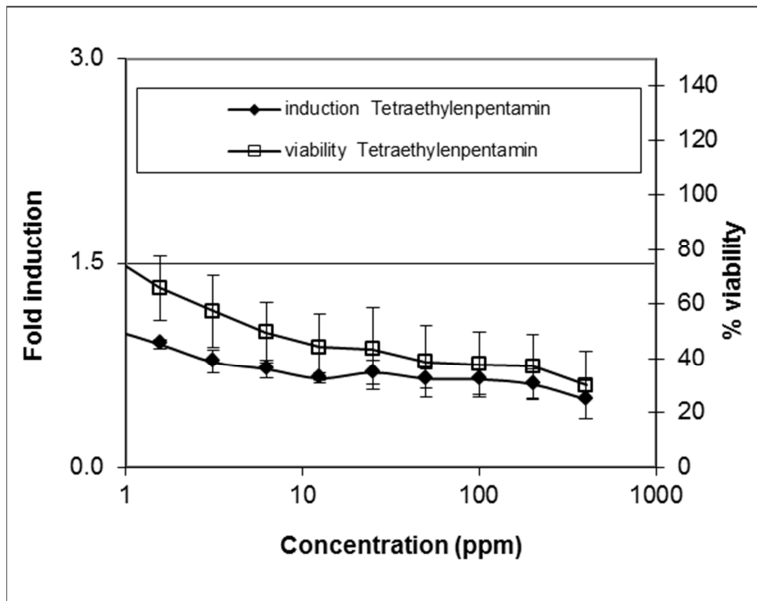


Figure 7. Dose response curves for Tetraethylenpentin. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

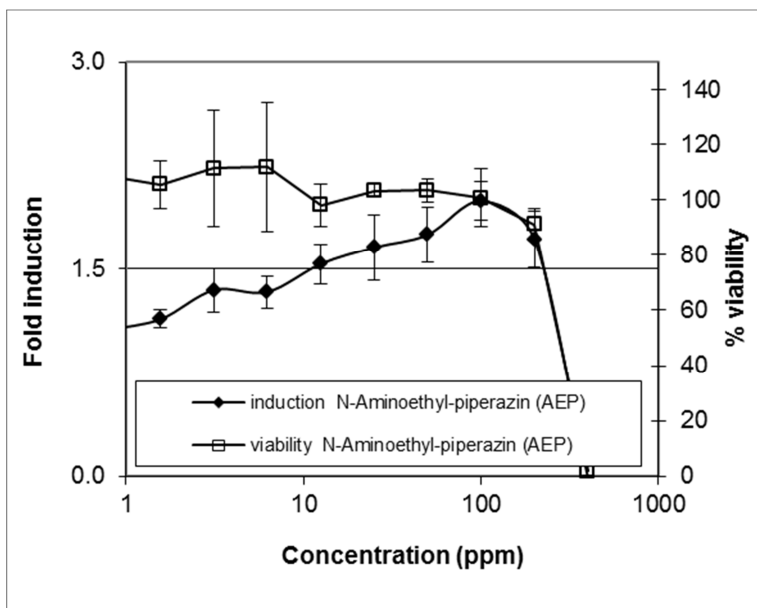


Figure 8. Dose response curves for N-Aminoethyl-piperazin (AEP). Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

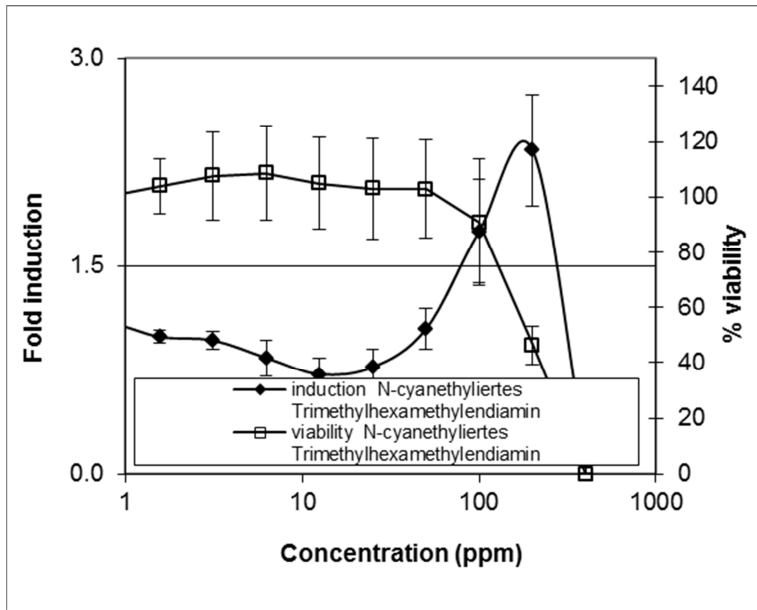


Figure 9. Dose response curve for N-cyanethylertes Trimethylhexamethylendiamin. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

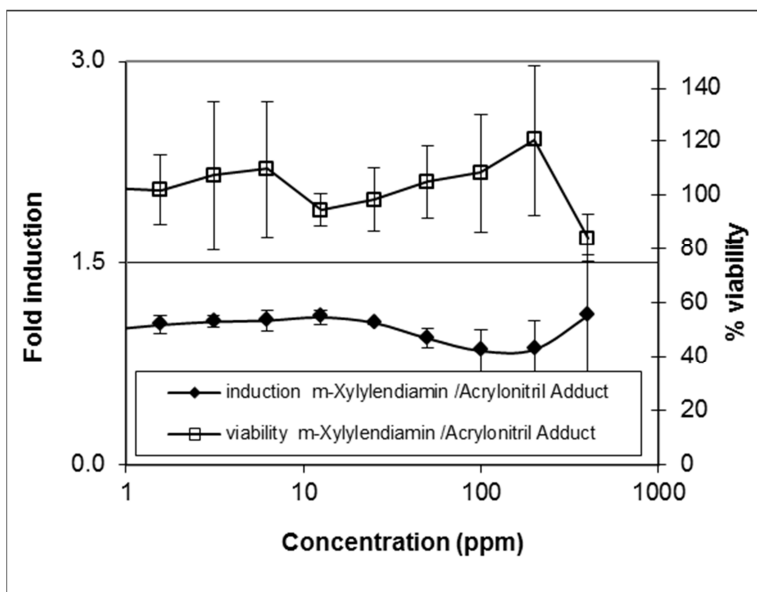


Figure 10. Dose response curve for m-Xylylendiamin /Acrylonitril Adduct. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)..

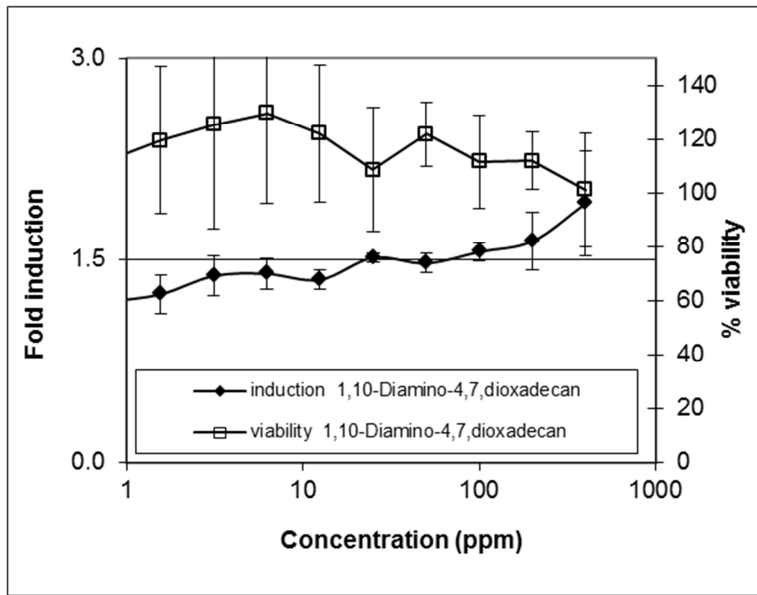


Figure 11. Dose response curve for 1,10-Diamino-4,7,dioxadecan. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

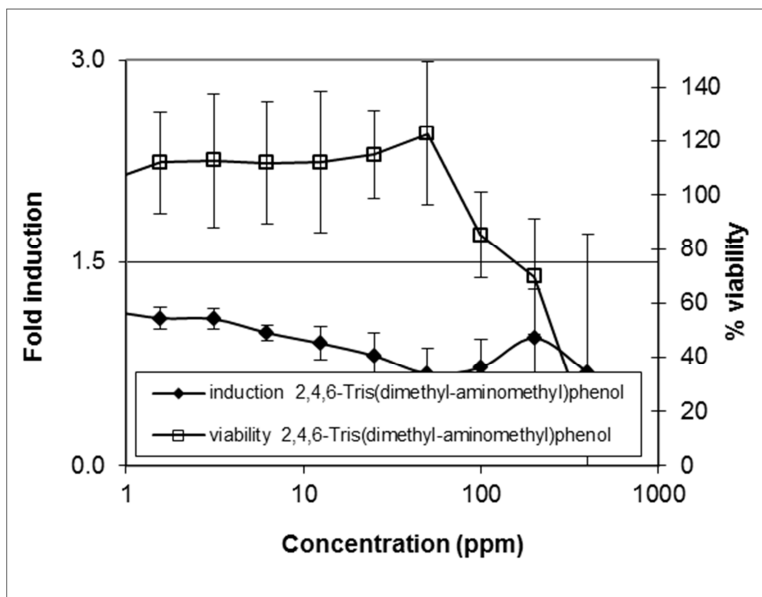


Figure 12. Dose response curve for 2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

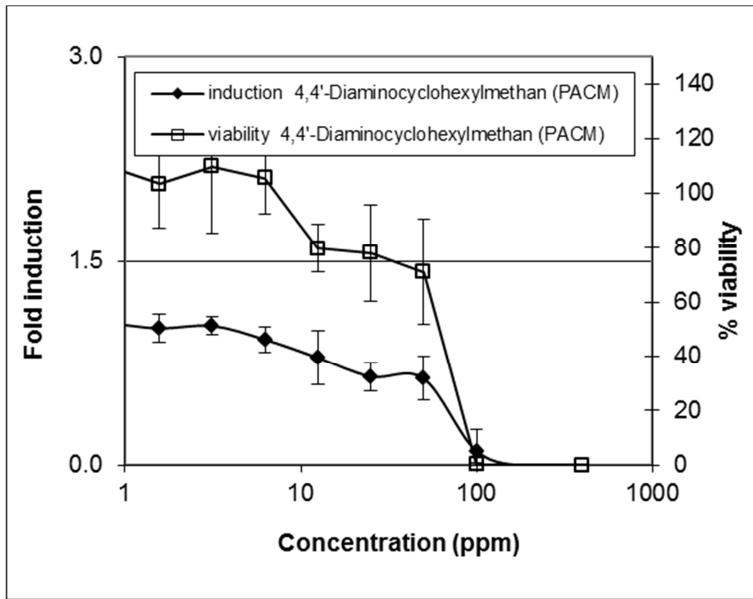


Figure 13. Dose response curve for 4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM). Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

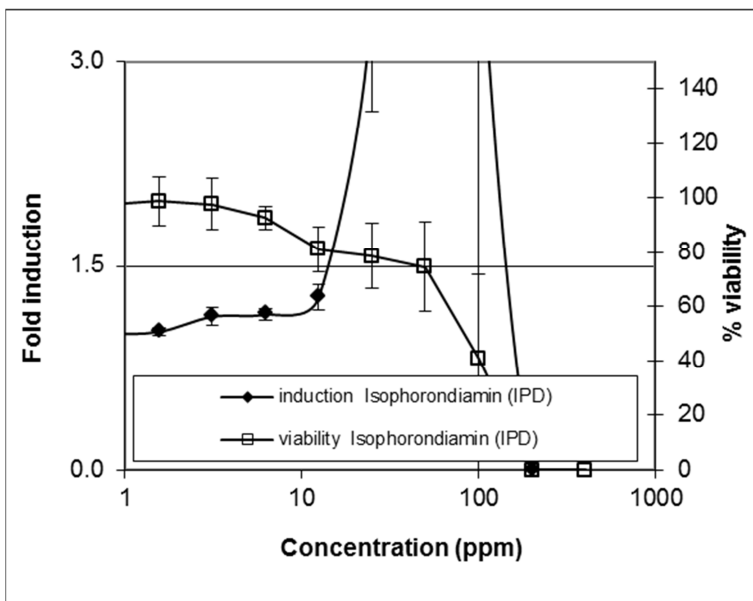


Figure 14. Dose response curve for Isophorondiamin (IPD). Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares). Chemical tested up to 500 µM due to solubility limitations,, see text.

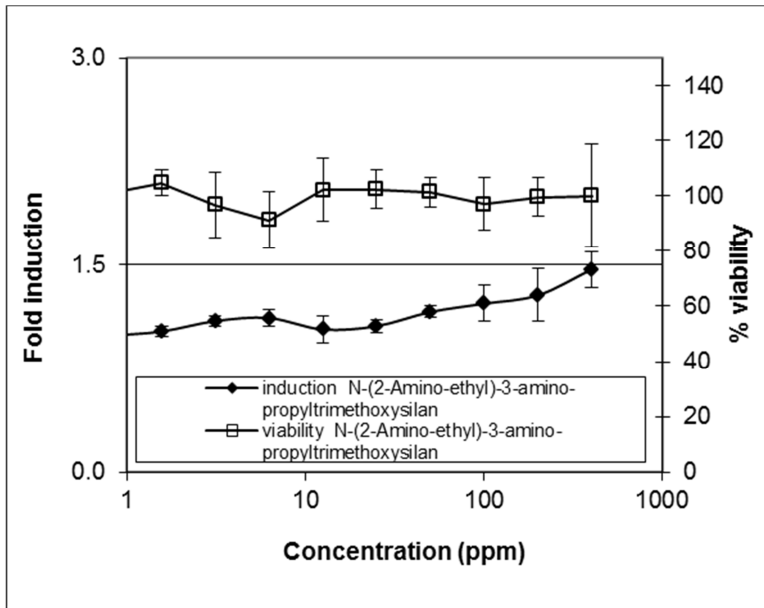


Figure 15. Dose response curve for N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares).

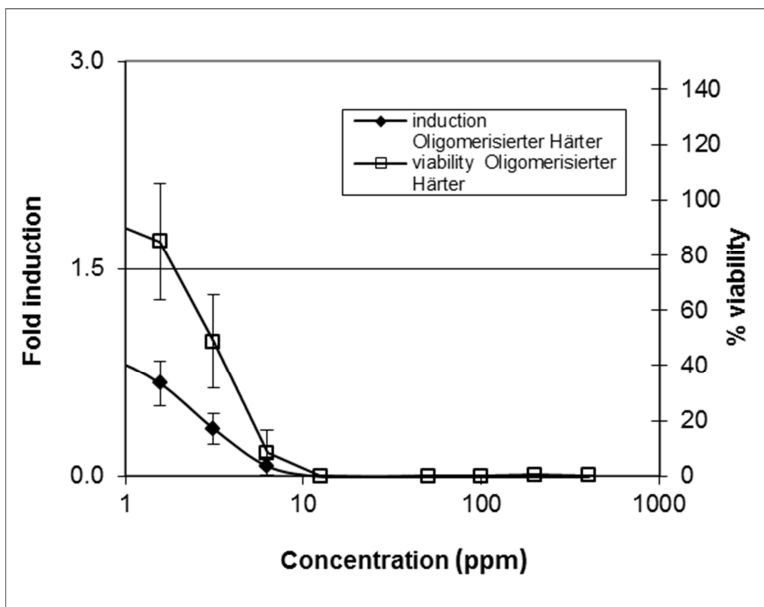


Figure 16. Dose response curve for Oligomerisierter Härter. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

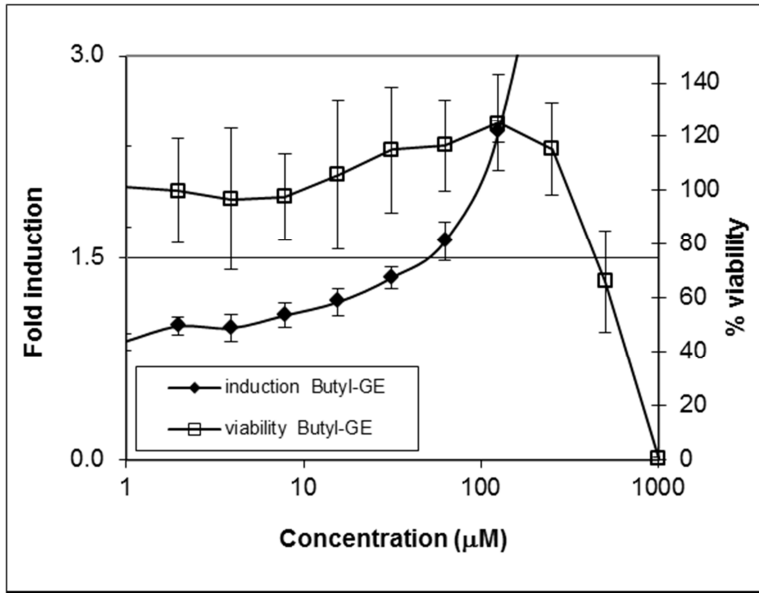


Figure 17. Dose response curve for Butyl-GE. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

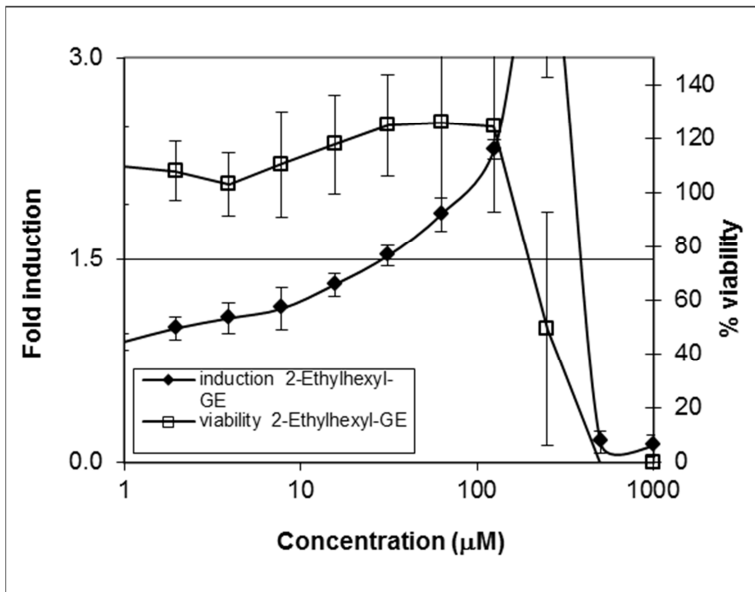


Figure 18. Dose response curve for 2-Ethylhexyl-GE. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

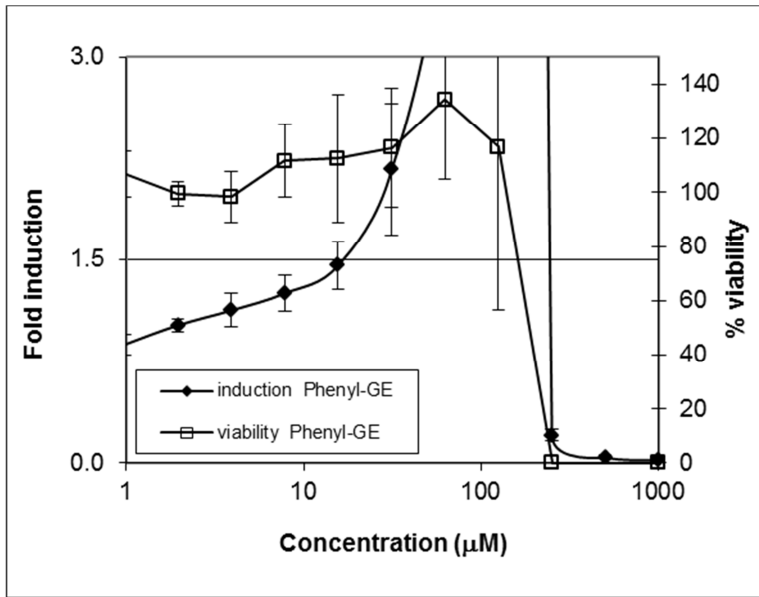


Figure 19. Dose response curve for Phenyl-GE. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

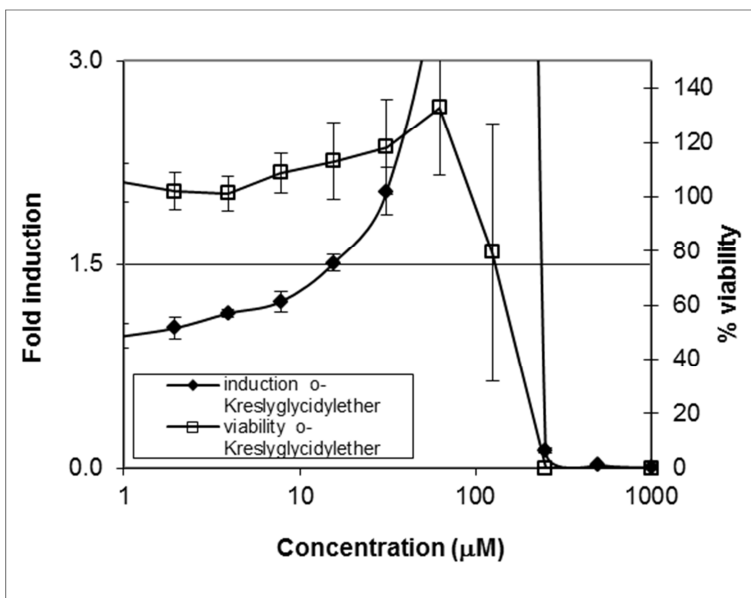


Figure 20. Dose response curve for o-Kreslyglycidylether. Given is the fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

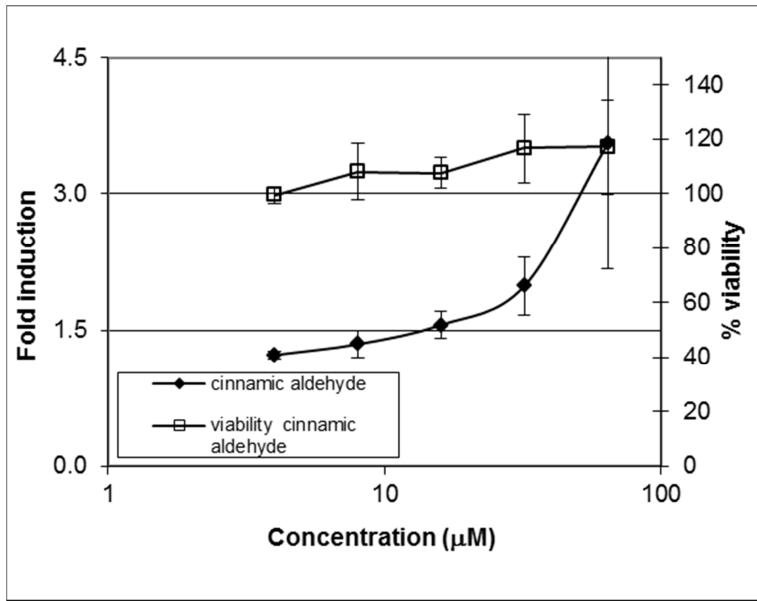


Figure 21. Positive control cinnamic aldehyde, masterplate 1. Fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

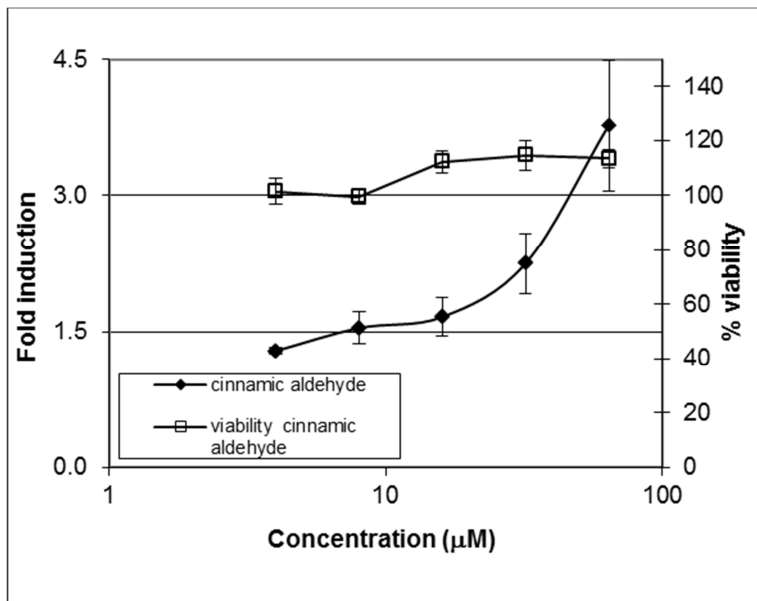


Figure 22. Positive control cinnamic aldehyde, masterplate 2. Fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

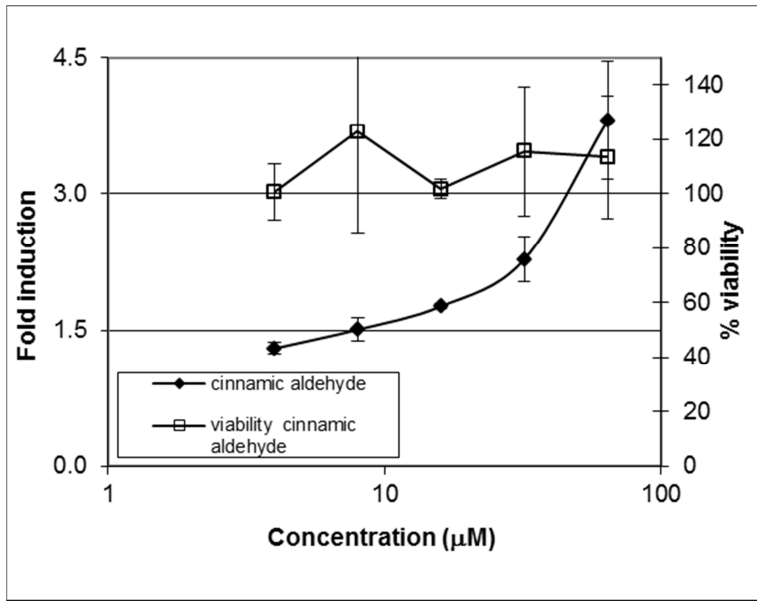


Figure 23. Positive control cinnamic aldehyde, masterplate 3. Fold induction of the luciferase gene over solvent control (filled diamonds) and the % viability as determined with the MTT assay (open squares)

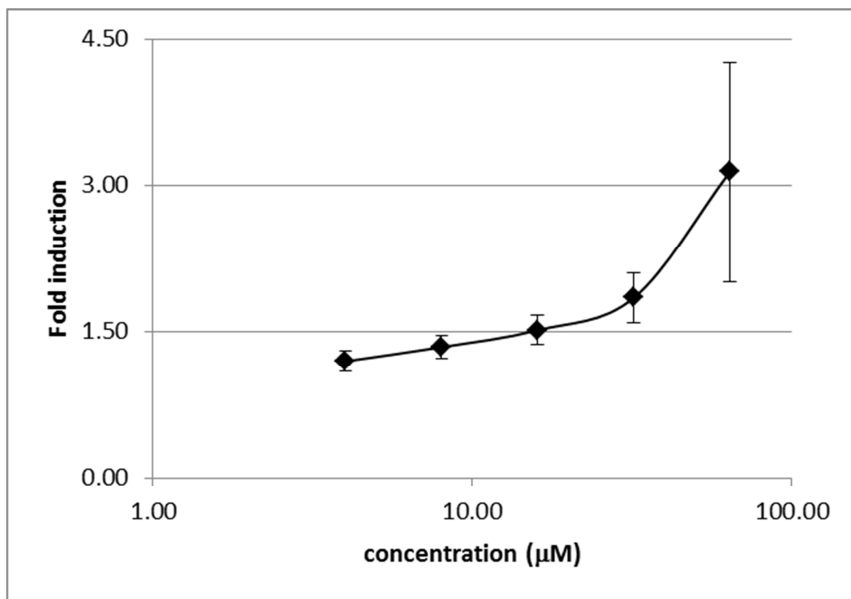


Figure 24. Historical results for luciferase induction by the positive control in the test laboratory: Shown are average and standard deviations from 46 valid runs conducted in 2014. In total 47 runs were run and only one was not valid for the positive control.

8. Data recalculated in molarity

Table 10. Cytotoxicity determinations. Given is the IC50 value as the concentration in μM reducing the viability by 50% as determined with the MTT assay.

	Rep 1 IC50 (μM)	Rep 2 IC50 (μM)	Rep 3 IC50 (μM)	Geometric Mean IC 50 (μM)
Ethylendiamin (EDA)	1612.2	1530.8	1458.4	1532.5
Diethylentriamin (DETA)	2841.7	3483.1	>3875.9	3146.1
Dipropylentriamin	>3048.3	2803.0	>3048.3	>3048.3
Trimethylhexamethylendiamin (TMD)	1270.0	764.0	991.3	987.1
Triethylentetramin	1799.1	1908.0	>2735.4	1852.7
N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan	1564.0	1345.9	1334.1	1410.9
Tetraethylenpentamin	10.3	30.8	256.7	43.3
N-Aminoethyl-piperazin (AEP)	2271.7	2302.1	2209.6	2260.8
N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin	939.0	978.9	828.1	913.1
m-Xylylendiamin /Acrylonitril Adduct	>2017.1	>2017.1	>2017.1	>2017.1
1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	>2268.8	>2268.8	>2268.8	>2268.8
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	1306.1	688.1	1010.8	968.5
4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM)	327.2	222.6	335.2	290.1
Isophorondiamin (IPD)	693.8	333.4	656.0	533.4
N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	>1798.6	>1798.6	>1798.6	>1798.6
Oligomerisierter Härter	not applicable	not applicable	not applicable	not applicable

Table 11. Luciferase determinations. Given is the EC1.5 value as the concentration in μM inducing the luciferase activity 1.5-fold up to a concentration of 1000 μM .

	Rep 1 EC1.5 (μM)	Rep 2 EC1.5 (μM)	Rep 3 EC1.5 (μM)	Geometric Mean EC1.5 (μM)
Ethylendiamin (EDA)	451.7	521.6	496.3	489.0
Diethylentriamin (DETA)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Dipropylentriamin	1180.4	58.6	651.7	356.0
Trimethylhexamethylendiamin (TMD)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Triethylentetramin	n.i.	5.5	n.i.	n.i.
N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Tetraethylenpentamin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
N-Aminoethyl-piperazin (AEP)	231.9	55.8	148.5	124.3
N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin	388.7	573.0	319.6	414.4
m-Xylylendiamin /Acrylonitril Adduct	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	118.3	33.0	553.1	129.2
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Isophorondiamin (IPD)	87.9	82.6	76.6	82.3
N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Oligomerisierter Härter	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

n.i. = no induction above threshold

Table 12. Luciferase determinations. Given is the EC2 value as the concentration in μM inducing the luciferase activity 2-fold up to a concentration of 1000 μM .

	Rep 1 EC2 (μM)	Rep 2 EC2 (μM)	Rep 3 EC2 (μM)	Geometric Mean EC2 (μM)
Ethylendiamin (EDA)	560.6	867.3	664.3	686.1
Diethylentriamin (DETA)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Dipropylentriamin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Trimethylhexamethylendiamin (TMD)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Triethylentetramin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Tetraethylenpentamin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
N-Aminoethyl-piperazin (AEP)	n.i.	483.8	n.i.	n.i.
N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin	637.7	n.i.	439.7	529.5
m-Xylylendiamin /Acrylonitril Adduct	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Isophorondiamin (IPD)	115.5	97.7	89.7	100.4
N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Oligomerisierter Härter	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

n.i. = no induction above threshold

Table 13. Luciferase determinations. Given is the EC3 value as the concentration in μM inducing the luciferase activity 3-fold up to a concentration of 1000 μM .

	Rep 1 EC3 (μM)	Rep 2 EC3 (μM)	Rep 3 EC3 (μM)	Geometric Mean EC3 (μM)
Ethylendiamin (EDA)	778.6	1340.4	971.8	1004.7
Diethylentriamin (DETA)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Dipropylentriamin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Trimethylhexamethylendiamin (TMD)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Triethylentetramin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
N,N-Dimethyl-1,3-diamino-propan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Tetraethylenpentamin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
N-Aminoethyl-piperazin (AEP)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
N-cyanethyliertes Trimethylhexamethylendiamin	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
m-Xylylendiamin /Acrylonitril Adduct	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
1,10-Diamino-4,7,dioxadecan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
4,4'-Diaminocyclohexylmethan (PACM)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Isophorondiamin (IPD)	156.8	127.9	115.7	132.4
N-(2-Amino-ethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Oligomerisierter Härter	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

n.i. = no induction above threshold

FINAL REPORT

Local Lymph Node Assay: A Ranking Study using Glycidyl 2-methylphenyl ether, Bis(3-aminopropyl)amine, ipox EH 2240, VESTAMIN IPD and IPD-Polymer DBC-15-01

Study code: 15/518-037E

Study Director: Judit Hargitai, Ph.D.

20 May 2016

STATEMENT OF THE STUDY DIRECTOR

This study has been performed in accordance with the Study Plan, the OECD Guidelines for Testing of Chemicals No. 429, Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay (22 July 2010); Commission Regulation (EC) No. 440/2008 of 30 May 2008, B.42., Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay as amended by Commission Regulation (EU) No. 640/2012 of 6 July 2012 and the Principles of Good Laboratory Practice as specified by national Hungarian GLP Regulations of 42/2014. (VIII. 19.) EMMI decree of the Ministry of Human Capacities which corresponds to the OECD GLP, ENV/MC/CHEM (98) 17.

I, the undersigned, declare that this report constitutes a true record of the actions undertaken and the results obtained in the course of this study. By virtue of my dated signature I accept the responsibility for the validity of the data and the following conclusion drawn from them:

In conclusion, under the conditions of the present ranking study at fixed dose levels (where there was some irritation present in some cases), the sensitization potential of the test items was considered to be:

Glycidyl 2-methylphenyl ether (CAS No: 2210-79-9) > Bis(3-aminopropyl) amine (CAS No.: 56-18-8) ≈ VESTAMIN IPD (CAS No.: 2855-13-2).

ipox EH 2240 (CAS No.: 90530-16-8 / 73050-11-0) and IPD-POLYMER DBC-15-01 (CAS No.: 38294-64-3) were shown to have no sensitization potential (non-sensitizers) in this Local Lymph Node Assay.

Signature: _____

Hargitai Judit

Date: _____

20 May 2016

Judit Hargitai, Ph.D.
Study Director

STATEMENT OF THE MANAGEMENT

According to the conditions of the research and development agreement between Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (as Sponsor) and CiToxLAB Hungary Ltd. (as Test Facility), the study titled "Local Lymph Node Assay: A Ranking Study using Glycidyl 2-methylphenyl ether, Bis(3-aminopropyl)amine, ipox EH 2240, VESTAMIN IPD and IPD-Polymer DBC-15-01" has been performed on CBA/CaOlaHsd mice, in accordance with the GLP requirements.

Signature: _____



Szabolcs Gáty, M.Sc.
Senior Director of Operations

Date: _____

20 May 2016

QUALITY ASSURANCE STATEMENT

Study Code: 15/518-037E

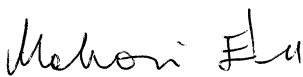
Study Title: Local Lymph Node Assay: A Ranking Study using Glycidyl 2-methylphenyl ether, Bis(3-aminopropyl)amine, ipox EH 2240, VESTAMIN IPD and IPD-Polymer DBC-15-01

Test Items: Glycidyl 2-methylphenyl ether (CAS No: 2210-79-9)
 Bis(3-aminopropyl)amine (CAS No.: 56-18-8)
 ipox EH 2240 (CAS No.: 90530-16-8 / 73050-11-0)
 VESTAMIN IPD (CAS No.: 2855-13-2)
 IPD-Polymer DBC-15-01 (CAS No.: 38294-64-3)

In order to enable the results of this study to meet legal requirements including regulatory submission and/or safety assessment, this study has been inspected, and this report audited by the Quality Assurance Unit in compliance with the Principles of Good Laboratory Practice. As far as it can be reasonably established the methods described and the results incorporated in this report accurately reflect the raw data produced during this study.

All inspections, data reviews and the report audit were reported in written form to the study director and to management. The dates of such inspections and of the report audit are given below:

Date of Inspection	Phase(s) Inspected/Audited	Date of report to	
		Management	Study Director
22 March 2016	Study Plan	22 March 2016	22 March 2016
23 March 2016	Treatment	23 March 2016	23 March 2016
04 May 2016	Draft Report	04 May 2016	04 May 2016
20 May 2016	Final Report	20 May 2016	20 May 2016

Signature:  Date: 20 May 2016
 Éva Fábíánné Makovi, B.Sc.
 On behalf of QA

GENERAL INFORMATION

- STUDY TITLE** : Local Lymph Node Assay: A Ranking Study using Glycidyl 2-methylphenyl ether, Bis(3-aminopropyl)amine, ipox EH 2240, VESTAMIN IPD and IPD-Polymer DBC-15-01
- TEST ITEMS** : Glycidyl 2-methylphenyl ether (CAS No: 2210-79-9)
Bis(3-aminopropyl)amine (CAS No.: 56-18-8)
ipox EH 2240 (CAS No.: 90530-16-8 / 73050-11-0)
VESTAMIN IPD (CAS No.: 2855-13-2)
IPD-Polymer DBC-15-01 (CAS No.: 38294-64-3)
- SPONSOR** : Forschungs- und Beratungsinstitut
Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)
Address: Klarastraße 63,
79106 Freiburg, Germany
- STUDY MONITOR** : Dr. Karin Heine
FoBiG
E-mail: karin.heine@fobig.de
- TEST FACILITY** : CiToxLAB Hungary Ltd.
Address: Veszprém, Szabadságpuszta
H-8200, Hungary
Phone: +36 88-545-300
Fax: +36 88-545-301
- STUDY DIRECTOR** : Judit Hargitai, Ph.D.
Phone: +36 88 545 273
E-mail: judit.hargitai@hu.citoxlab.com
- BASIS OF STUDY** : OECD Guidelines for Testing of Chemicals No. 429 “Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay” (22 July 2010)
Commission Regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008, B.42. “Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay” (Official Journal L 142, 31/05/2008) as amended by Commission Regulation (EU) No 640/2012 of 6 July 2012 (Official Journal L 193, 20/07/2012)

TEST FACILITY MANAGEMENT	:	Alyson Leyshon, M.Sc. Managing Director Szabolcs Gáty, M.Sc. Senior Director of Operations Jan Praslicka, DVM, Ph.D. Director of Scientific Operations David J. Esdaile, M.Sc. Director of Science and Regulatory Affairs
QUALITY ASSURANCE	:	Vanda Gyimesi, M.Sc. Director of QAU Éva Fábiánné Makovi, B.Sc. QA Inspector
RESPONSIBLE PERSONS*	:	Éva Váliczkó, M.Sc. – Assistant scientist Barbara Kanizsai, M.Sc. – Scientific assistant Lívia Lukács – Responsible technician István Pásztor, DVM – Veterinary control Tamás Mészáros, Ph.D. – Head of Pharmacy Dávid Szabó – statistical data processing Mátyás Hidvégi – statistical data processing

* Other trained, competent personnel worked on the study as required (documented in the raw data).

STUDY PLAN	:	22 March 2016
START OF EXPERIMENT	:	23 March 2016
END OF EXPERIMENT	:	01 April 2016
DRAFT REPORT	:	05 May 2016
FINAL REPORT	:	20 May 2016

Detailed study schedule is given in Appendix 1.

TABLE OF CONTENT

	Page
STATEMENT OF THE STUDY DIRECTOR	2
STATEMENT OF THE MANAGEMENT	3
QUALITY ASSURANCE STATEMENT	4
GENERAL INFORMATION	5
TABLE OF CONTENT	7
TABLES AND FIGURES	8
1. SUMMARY	9
2. INTRODUCTION	11
3. MATERIALS AND METHODS	11
3.1. TEST ITEMS	11
3.2. CONTROLS	14
3.3. OTHER CHEMICALS USED IN THE STUDY	15
3.4. INSTRUMENT SYSTEM	15
3.5. EXPERIMENTAL ANIMALS	16
3.6. ADMINISTRATION OF THE TEST ITEM	17
3.7. OBSERVATIONS	18
3.8. PROLIFERATION ASSAY	19
3.9. EVALUATION OF THE RESULTS	21
4. USE OF RADIOACTIVE MATERIALS	22
5. PERMISSION OF THE IACUC	22
6. ARCHIVES	22
7. DEVIATIONS TO THE STUDY PLAN	23
8. RESULTS AND DISCUSSION	23
8.1. CLINICAL OBSERVATIONS	23
8.2. BODY WEIGHT MEASUREMENT	23
8.3. EAR THICKNESS MEASUREMENTS	26
8.4. PROLIFERATION ASSAY	28
8.5. INTERPRETATION OF OBSERVATIONS	30
8.6. RELIABILITY OF THE TEST	32
9. CONCLUSION	33
10. DISTRIBUTION OF THE FINAL REPORT	33
11. REFERENCES	34
A P P E N D I C E S	35
APPENDIX 1 Study Schedule	36
APPENDIX 2 Copies of the Test Item Identification Documents	37
APPENDIX 3 Content of the Diet	43
APPENDIX 4 Summarized Clinical Observations	44
APPENDIX 5 Ear Thickness Measurements	50
APPENDIX 6 Historical Control Data	54
APPENDIX 7 Copy of the GLP Certificate	56

TABLES AND FIGURES

	Page
Table 1: Chemicals Used in the Experiments	15
Table 2: Experimental Groups and Treatments	18
Table 3: Erythema Scoring	19
Table 4: Individual Body Weights for all Animals with Group Means	24-25
Table 5: Summary of local irritation assessment	26-27
Table 6: DPM, DPN and Stimulation Index Values for all Groups	27-28
Table 7: Summary of Study Results	31
Figure 1: Test Item Stimulation Index Values	32
Table 8: Summarized Clinical Observations	45-49
Table 9: Ear Thickness Measurements	50-53
Table 10: Historical Control Data of the Positive and Negative Controls	54-55

1. SUMMARY

Despite the fact that there are some validated *in vitro* tests for testing sensitising characteristics - the aim of the current project is not to achieve hazard identification, but ranking the substances according to their sensitising potency instead. The LLNA is currently the only test validated for potency identification. Only a reduced form of LLNA (using two milestone concentrations) was performed, which is sufficient for the purpose of the project and reduces the number of animals needed. Moreover only a few critical substances were tested.

This study was a ranking test and it is not suitable for regulatory submission. The minimum number of animals was used in the study, corresponding to the regulatory guidelines being followed.

Based on the available information and as agreed by the Sponsor, Acetone: Olive oil 4:1 (v/v) mixture (abbreviated as AOO) was selected for vehicle of the study. Two milestone concentrations (10 and 2% (w/v)) were selected by the Sponsor for the study.

In the performed experiment, fifty two female CBA/CaOlaHsd mice were allocated to thirteen groups of four animals each:

- for each test item: two groups received the individual test item (Test Items A, B, C, D or E) formulated in AOO at 10 and 2% (w/v) concentrations,
- the negative control groups received the vehicle (AOO),
- the positive control group received 25% (w/v) HCA (dissolved in AOO).

The test item solutions were applied on the dorsal surface of ears of experimental animals (25 µL/ear) for three consecutive days (Days 1, 2 and 3). There was no treatment on Days 4, 5 and 6. On Day 6, the cell proliferation in the local lymph nodes was measured by incorporation of tritiated methyl thymidine (³HTdR) and the values obtained were used to calculate stimulation indices (SI).

No mortality or signs of systemic toxicity were observed during the study. No treatment related body weight loss was observed in the test item treated animals. Alopecia was observed in case of Test Item B (Bis(3-aminopropyl)amine) at 10% (w/v) concentration for one animal on Days 3-6 and for two animals on Days 5-6; and at 2% (w/v) concentration for two animals on Days 5-6. Slightly fixed ears were also observed in the 10% (w/v) dose group on Day 4 for animals and on Days 5-6 for one animal. In case of Test Item D (VESTAMIN IPD), minor wound was observed on all animals in the 10% (w/v) dose group on Days 4-6, slightly fixed ears were also recorded on Days 5-6. There was no indication of any irritancy at the site of application by visual examination, but ear thickness measurements indicated some local irritation for three animals in the 10% (w/v) Test Item B (Bis(3-aminopropyl)amine) dose group on Day 6 and for all animals in the 10% (w/v) Test Item D (VESTAMIN IPD) dose group on Day 6.

The stimulation index values measured at 10 and 2% concentrations were 16.1 and 4.7 for Test Item A (Glycidyl 2-methylphenyl ether); 4.3 and 2.6 for Test Item B (Bis(3-aminopropyl)amine), 1.2 and 0.5 for Test Item C (ipox EH 2240), 7.9 and 1.3 for Test Item D (VESTAMIN IPD) and 1.6 and 0.8 for Test Item E (IPD-POLYMER DBC-15-01), respectively.

The result of the positive control substance α -Hexylcinnamaldehyde (HCA) dissolved in the same vehicle was used to demonstrate the appropriate performance of the assay [1]. A significant lymphoproliferative response (stimulation index value of 5.3) was noted for the positive control chemical, this result confirmed the validity of the assay.

In conclusion, under the conditions of the present ranking study at fixed dose levels (where there was some irritation present in some cases), the sensitization potential of the test items was considered to be:

Glycidyl 2-methylphenyl ether (CAS No: 2210-79-9) > Bis(3-aminopropyl)amine (CAS No.: 56-18-8) \approx VESTAMIN IPD (CAS No.: 2855-13-2).

ipox EH 2240 (CAS No.: 90530-16-8 / 73050-11-0) and IPD-POLYMER DBC-15-01 (CAS No.: 38294-64-3) were shown to have no sensitization potential (non-sensitizers) in this Local Lymph Node Assay.

2. INTRODUCTION

The basic principle underlying the Local Lymph Node Assay (LLNA) is that skin sensitizers induce proliferation of lymphocytes in the lymph nodes draining the site of chemical application.

Generally, under appropriate test conditions, this proliferation is proportional to the concentration applied, and provides a means of obtaining an objective, quantitative measurement of sensitisation potential. The test measures cellular proliferation as a function of *in vivo* radioisotope incorporation into the DNA of dividing lymphocytes. The LLNA assesses proliferation in the draining auricular lymph nodes located in the cervical region at the bifurcation of the jugular vein. Lymphocyte proliferation in test groups is compared to that in the vehicle treated control. The ratio of the proliferation in test groups to that in the control, termed Stimulation Index (SI), is determined and must be at least equal or greater than three, for a test substance to classify as a potential skin sensitizer.

This study was performed at two milestone concentrations to determine the skin sensitisation potential of five test items following dermal exposure for classification and categorization. This study was a ranking test and it is not suitable for regulatory submission.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. TEST ITEMS

Routine safety precautions (lab coat, gloves, safety glasses and face mask) for each unknown materials were applied to assure personnel health and safety.

Test Item A

Product name:	Glycidyl 2-methylphenyl ether
Synonym:	o-Kreslyglycidylether
CAS number:	2210-79-9
Molecular weight:	164.2 g/mol
Substance classification:	Reactive diluent (glycidyl ether)
Supplier:	Sigma-Aldrich Co.
Batch/Lot No.:	MKBP7140V
Appearance:	Colourless liquid
Purity:	91.3%
Expiry date:	31 January 2017
Storage conditions:	Room temperature
Safety precautions:	Irritant, dangerous to the environment

Test Item B

Product name: Bis(3-aminopropyl)amine
Synonym: Dipropylenetriamine
CAS number: 56-18-8
Molecular weight: 131.22 g/mol
Substance classification: Hardener (aliphatic)
Supplier: Sigma-Aldrich Co.
Batch/Lot No.: BCBN2364V
Appearance: Colourless liquid
Purity: 99.5%
Expiry date: 31 May 2020
Storage conditions: Room temperature
Safety precautions: Very toxic, corrosive, harmful and irritant, suspected to cause genetic effects

Test Item C

Product name: ipox EH 2240
Synonym: m-Xylylenediamine / Acrylonitril Adduct
CAS number: 90530-16-8 (73050-11-0)
Substance classification: Hardener (others)
Supplier: Stauf Klebstoffwerke GmbH
Batch/Lot No.: 00238201
Appearance: Yellow liquid
Purity: Considered as 100%
Expiry date: 11 February 2017
Storage conditions: Room temperature
Safety precautions: Corrosive, irritant

Test Item D

Product name: VESTAMIN IPD
Synonym: Isophorone diamine (IPD)
CAS number: 2855-13-2
Molecular weight: 170.3 g/mol
Substance classification: Hardener (cycloaliphatic)
Supplier: Evonik Resource Efficiency GmbH
Batch/Lot No.: TWP 120116
Appearance: Colourless liquid
Purity: 99.9%
Expiry date: 31 January 2017
Storage conditions: Room temperature
Safety precautions: Corrosive, harmful, dangerous to the environment

Test Item E

Product name:	IPD-Polymer DBC-15-01
CAS number:	38294-64-3
Substance classification:	Hardener (others)
Supplier:	MC Bauchemie Müller GmbH &Co KG
Batch/Lot No.:	Go 5319
Appearance:	Yellow liquid
Purity:	Considered as 100%
Expiry date:	17 September 2016
Storage conditions:	Room temperature
Safety precautions:	Corrosive, irritant

3.1.1. Identification, Receipt

The test items of a suitable chemical purity were purchased from a commercial source (test items A and B) or sent from manufacturers (test items C, D and E) as requested by the Sponsor. All precautions required in the handling and disposal of the test items provided by the manufacturers will be archived with the raw data. Identification of the test items was performed on the basis of information provided in the Pharmacy of CiToxLAB Hungary Ltd. Copies of the relevant identification documents of the individual test items (Certificates of Analysis or Test Item Data Sheet) are shown in Appendix 2.

3.1.2. Vehicle selection

It is required by the relevant OECD and EU guidelines [1, 2, 3] that a test item should be incorporated into a vehicle system. The vehicle should be selected on the basis of maximising test concentrations and solubility whilst producing a solution/suspension suitable for application of the test substance.

Based on the available information and as agreed by the Sponsor, Acetone: Olive oil 4:1 (v/v) mixture (abbreviated as AOO) was selected for vehicle of the study. This vehicle is recommended by the OECD No. 429 guideline.

3.1.2. Formulation

To prepare the dosing formulations, the test items were freshly diluted with the selected vehicle to obtain appropriate concentrations in the Pharmacy of CiToxLAB Hungary Ltd. They were made shortly before application to mice (within 1 hour) and were considered to be stable for this short period. The applicable dose levels (two threshold concentrations) were selected by the Sponsor in accordance with the aim of the ranking study.

The test items were weighed and formulations prepared daily on a weight:volume basis as % (w/v) in the Pharmacy of CiToxLAB Hungary Ltd. Correction for purity of the test items was applied in the study to ensure the proper comparison.

Analytical determination of concentration, stability and homogeneity of the individual test item formulations was not performed because of the character and the short period of study, although the formulations were checked for visible homogeneity and physical stability. Test item formulations at 10 and 2% (w/v) concentrations appeared by visual inspection to be clear colourless solutions.

3.2. CONTROLS

Routine safety precautions (lab coat, gloves, safety glasses and face mask) were applied for negative and positive controls to assure personnel health and safety.

3.2.1. Negative Control

Animals assigned to the negative control group were treated with the vehicle (Acetone : Olive oil 4:1 (v/v) mixture, abbreviated as AOO in the raw data and report) only concurrent to the test item treated groups.

Data of the chemicals used for preparation of the vehicle of the study are listed below:

Name:	Acetone
Manufacturer:	Sigma-Aldrich Co.
Batch No.:	15J060514
Expiry date:	31 October 2020
Storage conditions:	Room temperature

Name:	Olive oil
Manufacturer:	Sigma-Aldrich Co.
Batch No.:	BCBP2124V
Expiry date:	31 January 2017
Storage conditions:	Room temperature, protected from light

3.2.2. Positive Control

Animals assigned to the positive control group were treated with 25% (w/v) α -Hexylcinnamaldehyde solution (dissolved in AOO) concurrent to the test items treated groups. The relevant data of the positive control substance are listed below:

Name: α -Hexylcinnamaldehyde
 Synonym: α -Hexyl cinnamic aldehyde
 Abbreviation: HCA
 CAS No.: 101-86-0
 Batch No.: MKBS3936V
 Manufacturer: Sigma-Aldrich Co.
 Nominal purity: $\geq 95\%$
 Purity: 97.3%
 Expiry: 31 July 2017

3.3. OTHER CHEMICALS USED IN THE STUDY

The data of the chemicals used in the study are summarized in Table 1.

Table 1: Chemicals Used in the Experiments

Chemical	Manufacturer / Supplier	Batch Number	Expiry date
Distilled water	HungaroPharma	828 1215	02 June 2016
Phosphate Buffered Saline, 10X concentrate (Abbreviation: PBS)	Sigma-Aldrich Co.	SLBN3963V	May 2016
Trichloroacetic acid (Abbreviation: TCA)	Sigma-Aldrich Co.	BCBP6482V	December 2016
[Methyl-3H]-Thymidine	American Radiolabeled Chemicals Inc.	160106 / PP013264F	-
Optiphase HiSafe 3	PerkinElmer	152-15321	01 March 2017

3.4. INSTRUMENT SYSTEM

Name: Tri-Carb 2810 Liquid Scintillation Analyzer
 Manufacturer: PerkinElmer
 Serial Number: DG10084483
 IQ / OQ Protocol #: 1593646-1
 Date of IQ: 25 November 2008
 Date of last OQ: 16 December 2015

3.5. EXPERIMENTAL ANIMALS

Species and strain:	CBA/CaOlaHsd mice
Source:	Envigo (formerly: Harlan Laboratories S.r.l.) San Pietro al Natisone (UD) Zona Industriale Azzida, 57, 33049 Italy
Hygienic level:	SPF at arrival; standard housing conditions during the study
Justification of strain:	On the basis of OECD Guideline, mice of CBA/Ca or CBA/J strain can be used. Females are used because the existing database is predominantly based on females.
Number of animals:	at least 4 animals / group
Sex:	Female, nulliparous, non pregnant
Age of animals at starting:	9 weeks old (age-matched, within one week)
Body weight range at starting:	18.0 – 20.9 g (the weight variation in animals in the study did not exceed $\pm 20\%$ of the mean weight)
Acclimatization time:	14 days

3.5.1. Husbandry

Animal health:	Only healthy animals were used for the study. Health status was certified by the veterinarian.
Housing / Enrichment:	Group caging / mice were provided with glass tunnel-tubes
Cage type:	Type II. polypropylene / polycarbonate
Bedding:	Bedding was available to animals during the study
Light:	12 hours daily, from 6.00 a.m. to 6.00 p.m.
Temperature:	20.3-24.8°C
Relative humidity:	23-76%
Ventilation:	15-20 air exchanges/hour

The temperature and relative humidity were recorded twice every day during the acclimatisation and experimental phases.

Room/Cabinet (non-radioactive phase):	507
Room/Cabinet (radioactive phase):	139 – 140

3.5.2. Food and feeding

Animals received ssniff® SM Rat/Mouse – Breeding & Maintenance, “autoclavable Complete diet for rats/mice” (Batch number: 540 5117, Expiry date: July 2016) produced by ssniff Spezialdiäten GmbH (Ferdinand-Gabriel-Weg 16, D-59494 Soest, Germany), *ad libitum*. The food was considered not to contain any contaminants that could reasonably be expected to affect the purpose or integrity of the study. The contents of the standard diet are detailed in Appendix 3.

3.5.3. Water supply

Animals received tap water from the municipal supply from 500 mL bottle, *ad libitum*. Water quality control analysis was performed once every three months and microbiological assessment was performed monthly by Veszprém County Institute of State Public Health and Medical Officer Service (ÁNTSZ, H-8201 Veszprém, József Attila u. 36., Hungary). Copies of the relevant Certificates of Analysis are retained in the Archive at CiToxLAB Hungary Ltd.

3.5.4. Bedding

Bedding of certified wood chips especially designed to keep animals in the best natural environment was provided for animals during the study. Lignocel 3/4S Fasern produced by J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co.KG (Holzmühle 1, 73494 Rosenberg, Germany) were available to animals during the study. Nest building material was also provided for animals (ARBOCEL natural crinklets produced by J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co.KG, Holzmühle 1, 73494 Rosenberg, Germany).

3.5.5. Identification and randomisation

A unique number written on the tail with a permanent marker identified each animal. The animal number was assigned on the basis of CiToxLAB Hungary Ltd.'s master file. The cages were marked with identity cards with information including study code, cage number, and dose group, sex and individual animal number.

The animals were randomised and allocated to the experimental groups. The randomisation was checked by computer software using the body weight to verify the homogeneity and variability between the groups.

3.6. ADMINISTRATION OF THE TEST ITEM

3.6.1. Dose Selection and Justification of Dose Selection

The selection of treatment concentrations was based on the recommendations of the relevant OECD guideline [1] as well as the guidance document for classification [4, 5].

Despite the fact that there are some validated *in vitro* tests available for testing sensitising characteristics of test items - the aim of the current project was not to achieve hazard identification, but ranking the substances according to their sensitising potency instead. The LLNA is currently the only test validated for potency identification. Only a reduced form of LLNA (using two milestone concentrations) was performed in the study, which was sufficient for the purpose of the project and reduced the number of animals needed. The experimental groups and dose levels of the study are summarized in Table 2.

Table 2: Experimental Groups and Treatments

Group	Test item concentration (% w/v)	Number of animals
Negative (vehicle) control (AOO)	-	4
Glycidyl 2-methylphenyl ether in AOO	10	4
Glycidyl 2-methylphenyl ether in AOO	2	4
Bis(3-aminopropyl)amine in AOO	10	4
Bis(3-aminopropyl)amine in AOO	2	4
ipox EH 2240 in AOO	10	4
ipox EH 2240 in AOO	2	4
VESTAMIN IPD in AOO	10	4
VESTAMIN IPD in AOO	2	4
IPD-Polymer DBC-15-01 in AOO	10	4
IPD-Polymer DBC-15-01 in AOO	2	4
Negative (vehicle) control (AOO)	-	4
Positive control (25% HCA in AOO)	-	4

3.6.2. Topical application

During the study, animals were topically dosed with 25 µL of the appropriate formulation using a pipette on the dorsal surface of each ear. Each animal was dosed once a day for three consecutive days (Days 1, 2 and 3). There was no treatment on Days 4, 5 and 6.

3.7. OBSERVATIONS

3.7.1. Clinical Observations

During the study (Day 1 to Day 6) each animal was observed daily for any clinical signs, including local irritation and systemic toxicity. Clinical observations were performed at least twice a day (before and after treatments) on Days 1, 2 and 3 and once daily on Days 4, 5 and 6. Individual records were maintained.

Both ears of each mouse were observed for erythema and scored using Table 3 [6]. Individual records were maintained.

Table 3: Erythema Scoring

Observation	Score
No erythema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well-defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beef redness) to eschar formation preventing grading of erythema	4

Note: Excessive local skin irritation is indicated by an erythema score ≥ 3 on any day of measurement.

3.7.2. Measurement of Body Weight

Individual body weights were recorded on Day 1 (beginning of the test) and on Day 6 (prior to $^3\text{HTdR}$ injection) with a precision of ± 0.1 g.

3.7.3. Ear Thickness Measurements

Ear thickness was measured in the study using a thickness gauge on Day 1 (pre-dose), Day 3 (approximately 48 hours after the first dose) and Day 6. Additional quantification of the ear thickness was also performed by ear punch weight determination on Day 6 after the euthanasia of the experimental animals.

Excessive local skin irritation is indicated by an increase in ear thickness of $\geq 25\%$ on any day of measurement.

3.8. PROLIFERATION ASSAY

3.8.1. Injection of Tritiated Thymidine ($^3\text{HTdR}$)

On Day 6, animals were taken to the radioactive suite and each mouse was intravenously injected via the tail vein with 250 μL of sterile PBS (phosphate buffered saline) containing approximately 20 μCi of $^3\text{HTdR}$ using a gauge 25G x 1" hypodermic needle with 1 mL sterile syringe. Once injected, the mice were left for 5 hours (± 30 minutes).

3.8.2. Removal and Preparation of Draining Auricular Lymph Nodes

Five hours (± 30 minutes) after intravenous injection the mice were euthanized by asphyxiation with ascending doses of carbon dioxide (deep anaesthesia was confirmed before making incision, death was confirmed before discarding carcasses). The draining auricular lymph nodes were excised by making a small incision on the skin between the jaw and sternum, pulling the skin gently back towards the ears and exposing the lymph nodes. The nodes were then removed using forceps. The carcasses were discarded after cervical dislocation or after cutting through major cervical blood vessels.

Once removed, the nodes of mice were collected in separate Petri dishes containing a small amount (1-2 mL) of PBS to keep the nodes wet before processing. The nodes of each animal were processed individually.

3.8.3. Preparation of Single Cell Suspension of Lymph Node Cells

A single cell suspension (SCS) of lymph node cells (LNCs) was prepared and collected in disposable tubes by gentle mechanical disaggregating of the lymph nodes through a cell strainer using the plunger of a disposable syringe. The cell strainer was washed with PBS (up to 10 mL). LNCs were pelleted with a relative centrifugal force (RCF) of $190 \times g$ (approximately) for 10 minutes at 4°C .

After centrifugation supernatants were discarded. Pellets were gently resuspended and 10 mL of PBS was added to the tubes. The washing step was repeated twice. This procedure was repeated for the lymph nodes of each individual animal.

3.8.4. Determination of Incorporated $^3\text{HTdR}$

After the final washing step, supernatants were removed. Pellets were gently agitated resuspended and 3 mL of 5% (w/v) TCA solution was added to the tubes for precipitation of macromolecules. After overnight (approximately 18 hours) incubation at $2-8^\circ\text{C}$, precipitates were centrifuged (approximately $190 \times g$ for 10 minutes at 4°C), and supernatants were removed.

Pellets were resuspended in 1 mL of 5% (w/v) TCA solution and dispersed by using an ultrasonic bath. Samples were transferred into a suitable sized scintillation vial filled with 10 mL of scintillation liquid and thoroughly mixed. The vials were loaded into a β -scintillation counter and $^3\text{HTdR}$ incorporation was measured (10-minute measurement).

The β -counter expresses the $^3\text{HTdR}$ incorporation as the number of radioactive disintegrations per minute (DPM). Background level was also measured in duplicates by adding 1 mL of 5% (w/v) TCA solution into a scintillation vial filled with 10 mL of scintillation liquid.

3.9. EVALUATION OF THE RESULTS

The proliferative response of lymph node cells from the lymph nodes of each individual animal was expressed as radioactive disintegrations per minute (DPM) per animal. The measured DPM values were corrected with the background DPM value ("DPM"). The average of the two measured DPM values of 5% (w/v) TCA solutions was used as background DPM value. The results were expressed as disintegrations per node (DPN = DPM divided by the number of lymph nodes) for each animal, following the industry standard for data presentation.

Stimulation index (SI = mean DPN of treated group divided by mean DPN of the appropriate control group) for each treatment group was also calculated. A stimulation index of 3 or greater is an indication of a positive result.

The use of the individual approach to calculate SI made the use of a statistical analysis available. The statistical analysis was performed using the SPSS/PC+ (4.0) software package. The heterogeneity of variance between groups was checked by Bartlett's test for the measured DPM values. Where no significant heterogeneity was detected, a one-way analysis of variance was carried out. If the result was positive, then Duncan's Multiple Range test was used to assess the significance of inter-group differences. Where significant heterogeneity was found, the normal distribution of data was examined by Kolmogorow-Smirnow test. In the case of not normal distribution, the non-parametric method of Kruskal-Wallis One-Way analysis of variance was applied. If a positive result was detected, the inter-group comparisons were performed using Mann-Whitney U-test.

3.9.1. Interpretation of Results

The test item is regarded as a sensitizer if both of the following criteria are fulfilled:

- That exposure to at least one concentration of the test item resulted in an incorporation of ³HTdR at least 3-fold or greater than recorded in control mice, as indicated by the stimulation index.
- The data are compatible with a conventional dose response, although allowance must be made (especially at high topical concentrations) for either local toxicity or immunological suppression.

If the test item gave a positive response, the EC3 value of the test item (= concentration of test item which results in a SI of 3) was calculated [7, 8]. In those cases, where SI values above and below the threshold limit of 3 were detected, the calculation of the EC3 value was conducted by linear interpolation according to the equation (where the data points lying immediately above and below the SI value of 3 on the LLNA dose-response plot have the co-ordinates (a,b) and (c,d) respectively):

$$EC3 = c + [(3-d)/(b-d)] \times (a-c)$$

In those cases where both detected SI values were above the threshold limit of 3, the calculation of the EC3 value was conducted by a log-linear extrapolation according to the equation using data of the two lowest concentrations as follows (where the data point with the higher SI value on the LLNA dose-response plot have the co-ordinates (a,b) and data point with lower SI has the coordinates (c,d), respectively):

$$EC3 = 2^{\{\log_2(c) + (3-d)/(b-d) \times [\log_2(a) - \log_2(c)]\}}$$

3.9.2. Acceptability of the test

The Local Lymph Node Assay is considered valid if it meets the following criteria:

- the DPN value of the negative (vehicle) control group falls within the range of historical laboratory control data,
- the positive control substance produces a significant lymphoproliferative response increases (SI>3),
- each treated and control group includes at least 4 animals,
- the test item does not cause serious systemic or local toxicity.

4. USE OF RADIOACTIVE MATERIALS

Use of radioactive materials was recorded in the appropriate register. Regular decontamination of the working area with a verification of decontamination was carried out. Radioactive waste materials were processed according to normal laboratory standards.

5. PERMISSION OF THE IACUC

The conduct of the study was permitted by Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) on 22 March 2016.

6. ARCHIVES

The study documents and samples (including but not limited to: the original study plan, all raw data, a sample of each individual test item, original study report and any amendments, correspondence) will be stored for 15 years according to the Hungarian GLP regulation [9] and the applicable SOPs of the Test Facility in the Archives of CiToxLAB Hungary Ltd. (Veszprém, Szabadságpuszta, H-8200 Hungary).

Samples that are unstable may be disposed of before the time required by GLP, but not without Sponsor's prior written consent. Unless otherwise agreed upon, remaining test item will be offered to the Sponsor for further disposal. No raw data or material relating to the study will be discarded without the Sponsor's prior written consent.

7. DEVIATIONS TO THE STUDY PLAN

Due to technical reason, relative humidity values (23-76%) outside the expected range of 30-70% were detected during the study. However, these minor differences in the environmental parameters were considered not to adversely affect the results or integrity of the study as confirmed by the clinical veterinarian.

Due to technical reasons, the measurement of radioactive samples were performed within four days after the preparation to get analyzable data (for more details see 8.4.), consequently the in life phase ended on 01 April 2016 instead of 29 March 2016. Based on the half life of the ³H isotope (over 12 years), the four days difference could not influence the activity of the samples in a measurable manner. Therefore, this fact was considered not to adversely affect the results or integrity of the study.

8. RESULTS AND DISCUSSION

8.1. CLINICAL OBSERVATIONS

No mortality or signs of systemic toxicity were observed during the study. Alopecia was observed in case of Test Item B (Bis(3-aminopropyl)amine) at 10% (w/v) concentration for one animal on Days 3-6 and for two animals on Days 5-6; and at 2% (w/v) concentration for two animals on Days 5-6. Slightly fixed ears were also observed in the 10% (w/v) dose group on Day 4 for animals and on Days 5-6 for one animal. In case of Test Item D (VESTAMIN IPD), minor wound was observed on all animals in the 10% (w/v) dose group on Days 4-6, slightly fixed ears were also recorded on Days 5-6. The results of the observations are summarized in Table 8 of Appendix 4.

8.2. BODY WEIGHT MEASUREMENT

No clear treatment related effects on body weight were observed in the study. Although marked body weight loss ($\geq 5\%$) was detected for one negative control animals, one animal in the 10% (w/v) Glycidyl 2-methylphenyl ether group, two animals in the 10% (w/v) Bis(3-aminopropyl)amine group, one animal in the 2% (w/v) Bis(3-aminopropyl)amine group, one animal in the 10% (w/v) ipox EH 2240 group and one animal in the 10% (w/v) VESTAMIN IPD group, but based on the body weights of the other animals in those groups, these facts were considered as animal variability. Individual and mean body weights are given in Table 4.

Table 4: Individual Body Weights for all Animals with Group Means

Identity Number	Animal Number	Test Group Name	Initial Body Weight (g)	Terminal Body Weight* (g)	Change# (%)
1441	1	Negative (vehicle) control (AOO)	20.3	20.8	2.5
1424	2		18.7	19.4	3.7
1454	3		18.9	18.8	-0.5
1430	4		19.5	20.7	6.2
1509	45		20.1	20.0	-0.5
1496	46		19.2	18.0	-6.3
1520	47		19.1	19.3	1.0
1513	48		18.8	19.0	1.1
Mean			19.3	19.5	0.9
1452	5	Test Item A Glycidyl 2-methylphenyl ether 10% (w/v) in AOO	20.6	18.2	-11.7
1426	6		19.1	21.1	10.5
1471	7		18.8	18.3	-2.7
1460	8		18.0	20.5	13.9
Mean			19.1	19.5	2.5
1502	9	Test Item A Glycidyl 2-methylphenyl ether 2% (w/v) in AOO	20.8	20.7	-0.5
1488	10		18.8	20.2	7.4
1510	11		19.8	19.8	0.0
1494	12		18.1	18.3	1.1
Mean			19.4	19.8	2.0
1519	13	Test Item B Bis(3-aminopropyl)amine 10% (w/v) in AOO	20.1	18.4	-8.5
1512	14		20.0	18.5	-7.5
1516	15		18.0	18.2	1.1
1445	16		18.7	19.0	1.6
Mean			19.2	18.5	-3.3
1434	17	Test Item B Bis(3-aminopropyl)amine 2% (w/v) in AOO	20.3	20.9	3.0
1427	18		19.4	19.6	1.0
1449	19		19.7	18.7	-5.1
1467	20		18.5	19.1	3.2
Mean			19.5	19.6	0.5
1481	21	Test Item C ipox EH 2240 10% (w/v) in AOO	20.3	18.7	-7.9
1456	22		19.0	19.9	4.7
1474	23		19.4	20.0	3.1
1507	24		18.5	19.1	3.2
Mean			19.3	19.4	0.8

Notes:

1. *: Terminal body weights were measured on Day 6.
2. #: Body Weight Change = (Terminal Body Weight – Initial Body Weight) / Initial Body Weight x 100

Table 4: Individual Body Weights for all Animals with Group Means (continued)

Identity Number	Animal Number	Test Group Name	Initial Body Weight (g)	Terminal Body Weight* (g)	Change# (%)
1493	25	Test Item C	19.9	19.5	-2.0
1485	26	ipox EH 2240	20.7	21.5	3.9
1505	27	2% (w/v) in AOO	18.1	18.7	3.3
1499	28		18.3	19.3	5.5
		Mean	19.3	19.8	2.7
1491	29	Test Item D	20.1	20.2	0.5
1521	30	VESTAMIN IPD	19.1	18.8	-1.6
1514	31	10% (w/v) in AOO	18.6	19.1	2.7
1518	32		19.8	18.8	-5.1
		Mean	19.4	19.2	-0.9
1438	33	Test Item D	19.7	19.9	1.0
1429	34	VESTAMIN IPD	20.9	20.8	-0.5
1448	35	2% (w/v) in AOO	18.1	20.1	11.0
1436	36		18.3	19.2	4.9
		Mean	19.3	20.0	4.1
1422	37	Test Item E	20.7	20.2	-2.4
1464	38	IPD-POLYMER DBC-15-01	18.7	19.5	4.3
1477	39	10% (w/v) in AOO	19.1	18.8	-1.6
1455	40		18.7	19.4	3.7
		Mean	19.3	19.5	1.0
1469	41	Test Item E	19.9	20.7	4.0
1504	42	IPD-POLYMER DBC-15-01	19.2	20.0	4.2
1490	43	2% (w/v) in AOO	19.2	21.0	9.4
1483	44		18.7	20.0	7.0
		Mean	19.3	20.4	6.1
1501	49	Positive control	19.8	19.6	-1.0
1489	50	(25% (w/v) HCA in AOO)	19.2	19.8	3.1
1473	51		19.4	19.1	-1.5
1433	52		19.4	20.2	4.1
		Mean	19.5	19.7	1.2

Notes:

1. *: Terminal body weights were measured on Day 6.
2. #: Body Weight Change = (Terminal Body Weight – Initial Body Weight) / Initial Body Weight x 100

8.3. EAR THICKNESS MEASUREMENTS

Ear thickness of the animals was measured using by a thickness gauge and by ear punch weight determination. The ear thickness values and the weights of the ear punches (2 per animal) are summarized in Table 9 of Appendix 5. Significantly increased ear thickness values (increase of $\geq 25\%$) were recorded for three animals in the 10% (w/v) Test Item B (Bis(3-aminopropyl)amine) dose group on Day 6, for all animals in the 10% (w/v) Test Item D (VESTAMIN IPD) dose group on Day 6 and for one positive control animal on Day 6. Furthermore, slightly increased values was detected for other groups in several cases, but in those cases the results were below the limit of excessive local irritation, so they were considered as acceptable. The revealing ear punch weights were within the acceptable range in all cases.

There were no visual indications of any excessive irritancy at the site of application, although minor effect, erythema (maximum score of 1), was recorded for Test Item B (Bis(3-aminopropyl)amine) for all animals in the 10% (w/v) dose group on Days 3-5 and for one animal in the 2% (w/v) dose group on Day 4; and for Test Item D (VESTAMIN IPD) for all animals in the 10% (w/v) dose group on Days 4-5 and for one animal in the 2% (w/v) dose group on Day 4. Erythema scores are shown in Table 8 of Appendix 4.

Summary of local irritation assessment is shown in Table 5.

Table 5: Summary of local irritation assessment

Identity Number	Animal Number	Test Group Name	Max erythema score	Indication by ear thickness	Indication by biopsy weight	Summary result
1441	1	Negative (vehicle) control (AOO)	0	-	-	-
1424	2		0	-	-	-
1454	3		0	-	-	-
1430	4		0	-	-	-
1509	45		0	-	-	-
1496	46		0	-	-	-
1520	47		0	-	-	-
1513	48		0	-	-	-
1452	5	Test Item A Glycidyl 2-methylphenyl ether 10% (w/v) in AOO	0	-	-	-
1426	6		0	-	-	-
1471	7		0	-	-	-
1460	8		0	-	-	-
1502	9	Test Item A Glycidyl 2-methylphenyl ether 2% (w/v) in AOO	0	-	-	-
1488	10		0	-	-	-
1510	11		0	-	-	-
1494	12		0	-	-	-

Notes: +/-: Indication / No indication. Excessive local irritation was indicated by an erythema score ≥ 3 on any day of measurement; by an increase in ear thickness of $\geq 25\%$ on any day of measurement (mean value of two ears was considered); or by a biopsy weight $\geq 25\%$ above the historical control maximum value.

Table 5: Summary of local irritation assessment (continued)

Identity Number	Animal Number	Test Group Name	Max erythema score	Indication by ear thickness	Indication by biopsy weight	Summary result
1519	13	Test Item B	1	+	-	+
1512	14	Bis(3-aminopropyl)amine	1	+	-	+
1516	15	10% (w/v) in AOO	1	+	-	+
1445	16		1	-	-	-
1434	17	Test Item B	1	-	-	-
1427	18	Bis(3-aminopropyl)amine	0	-	-	-
1449	19	2% (w/v) in AOO	0	-	-	-
1467	20		0	-	-	-
1481	21	Test Item C	0	-	-	-
1456	22	ipox EH 2240	0	-	-	-
1474	23	10% (w/v) in AOO	0	-	-	-
1507	24		0	-	-	-
1493	25	Test Item C	0	-	-	-
1485	26	ipox EH 2240	0	-	-	-
1505	27	2% (w/v) in AOO	0	-	-	-
1499	28		0	-	-	-
1491	29	Test Item D	1	+	-	+
1521	30	VESTAMIN IPD	1	+	-	+
1514	31	10% (w/v) in AOO	1	+	-	+
1518	32		1	+	-	+
1438	33	Test Item D	0	-	-	-
1429	34	VESTAMIN IPD	0	-	-	-
1448	35	2% (w/v) in AOO	1	-	-	-
1436	36		0	-	-	-
1422	37	Test Item E	0	-	-	-
1464	38	IPD-POLYMER DBC-15-01	0	-	-	-
1477	39	10% (w/v) in AOO	0	-	-	-
1455	40		0	-	-	-
1469	41	Test Item E	0	-	-	-
1504	42	IPD-POLYMER DBC-15-01	0	-	-	-
1490	43	2% (w/v) in AOO	0	-	-	-
1483	44		0	-	-	-
1501	49	Positive control	0	-	-	-
1489	50	(25% (w/v) HCA in AOO)	0	-	-	-
1473	51		0	-	-	-
1433	52		0	+	-	+

Notes: +/-: Indication / No indication. Excessive local irritation was indicated by an erythema score ≥ 3 on any day of measurement; by an increase in ear thickness of $\geq 25\%$ on any day of measurement (mean value of two ears was considered); or by a biopsy weight $\geq 25\%$ above the historical control maximum value.

8.4. PROLIFERATION ASSAY

The results of the proliferation assay are summarized in Table 6 and Figure 1.

Larger / slightly larger than normal lymph nodes were observed for all animals in the 10% (w/v) dose groups of Test Items A, B and D (Glycidyl 2-methylphenyl ether, Bis(3-aminopropyl)amine and VESTAMIN IPD) as well as in the positive control positive control group, furthermore for one animal in the 2% (w/v) dose group of Test Item B (Bis(3-aminopropyl)amine); while the appearance of the lymph nodes was normal in the negative (vehicle) control group and in all other test item treated groups (subjective judgement by analogy with observations of former experiments).

The stimulation index values measured* at 10 and 2% concentrations were 16.1 and 4.7 for Test Item A (Glycidyl 2-methylphenyl ether); 4.3 and 2.6 for Test Item B (Bis(3-aminopropyl)amine), 1.2 and 0.5 for Test Item C (ipox EH 2240), 7.9 and 1.3 for Test Item D (VESTAMIN IPD) and 1.6 and 0.8 for Test Item E (IPD-POLYMER DBC-15-01), respectively.

*At the radio-label counting stage, there was a higher degree of fluctuations than usual in the signals of some samples, at the time of the measurement indicated in the Study Plan, most probably due to quenching factors. Visual turbidity was not seen in any of the samples. In order to be sure of adequate data, the whole set of samples (including the background vials and the samples of the negative and positives control groups) were re-measured several times (within four days after the preparation) to produce data that can be more reliably interpreted. Based on the half life of the ³H isotope (over 12 years), this measurement time difference would not influence the activity of the samples in a measurable manner. In the report, the mean DPM values are shown, but all the data of the individual measurements are kept and archived in the raw data binder. This fact was considered not to adversely affect the results or integrity of the study.

Table 6: DPM, DPN and Stimulation Index Values for all Groups

Test Group Name	Animal Number	Mean Total DPM#	Number of lymph nodes	DPN	Group DPN	Stimulation Index
Negative (vehicle) control (AOO)	1	3980.3	2	1990.1	1054.0	1.0
	2	1307.3	2	653.6		
	3	2524.8	2	1262.4		
	4	1744.0	2	872.0		
	45	821.3	2	410.6		
	46	658.0	2	329.0		
	47	3469.0	2	1734.5		
	48	2359.5	2	1179.8		
Test Item A Glycidyl 2-methylphenyl ether 10% (w/v) in AOO	5	32970.3	2	16485.1	16939.3	16.1**
	6	36492.3	2	18246.1		
	7	34035.3	2	17017.6		
	8	32016.5	2	16008.3		
Test item A Glycidyl 2-methylphenyl ether 2% (w/v) in AOO	9	5835.2	2	2917.6	4907.9	4.7**
	10	10011.0	2	5005.5		
	11	8719.3	2	4359.6		
	12	14698.0	2	7349.0		
Test item B Bis(3-aminopropyl) amine 10% (w/v) in AOO	13	5532.8	2	2766.4	4580.5	4.3**
	14	7304.5	2	3652.3		
	15	6369.5	2	3184.8		
	16	17437.0	2	8718.5		
Test item B Bis(3-aminopropyl) amine 2% (w/v) in AOO	17	4916.0	2	2458.0	2773.8	2.6**
	18	4341.3	2	2170.6		
	19	7185.3	2	3592.6		
	20	5748.3	2	2874.1		
Test item C ipox EH 2240 10% (w/v) in AOO	21	1997.5	2	998.8	1279.2	1.2
	22	2352.5	2	1176.3		
	23	4536.8	2	2268.4		
	24	1346.5	2	673.3		
Test item C ipox EH 2240 2% (w/v) in AOO	25	1729.0	2	864.5	565.0	0.5
	26	673.0	2	336.5		
	27	1198.0	2	599.0		
	28	920.3	2	460.1		

Notes:

1. #: The mean value of the repeated measurements performed within a four days period.
2. Background values were in the 30-34 DPM range in all cases.
3. #: The first negative control group before the test item samples had a DPN value of 1194.5; while the second negative control group after the test item samples had a DPN value of 913.5, these values indicated the proper consistency of the method. For SI calculation, the mean value was used.
4. * / ** = Significant (at $p < 0.05$ or $p < 0.01$ level respectively, Mann-Whitney U-test versus negative control)

Table 6: DPM, DPN and Stimulation Index Values for all Groups (continued)

Test Group Name	Animal Number	Mean Total DPM#	Number of lymph nodes	DPN	Group DPN	Stimulation Index
Test Item D VESTAMIN IPD 10% (w/v) in AOO	29	11152.0	2	5576.0	8318.8	7.9**
	30	22843.3	2	11421.6		
	31	16304.3	2	8152.1		
	32	16250.5	2	8125.3		
Test Item D VESTAMIN IPD 2% (w/v) in AOO	33	3356.0	2	1678.0	1399.3	1.3
	34	2500.3	2	1250.1		
	35	3298.5	2	1649.3		
	36	2039.3	2	1019.6		
Test Item E IPD-POLYMER DBC-15-01 10% (w/v) in AOO	37	4283.5	2	2141.8	1671.9	1.6
	38	3403.5	2	1701.8		
	39	3194.0	2	1597.0		
	40	2494.0	2	1247.0		
Test Item E IPD-POLYMER DBC-15-01 2% (w/v) in AOO	41	909.3	2	454.6	794.9	0.8
	42	1379.3	2	689.6		
	43	1295.8	2	647.9		
	44	2775.0	2	1387.5		
Positive control (25% (w/v) HCA in AOO)	49	13170.8	2	6585.4	5575.4	5.3**
	50	7457.0	2	3728.5		
	51	13640.5	2	6820.3		
	52	10334.8	2	5167.4		

Notes:

1. #: The mean value of the repeated measurements performed within a four days period.
2. Background values were in the 30-34 DPM range in all cases.
3. * / ** = Significant (at $p < 0.05$ or $p < 0.01$ level respectively, Mann-Whitney U-test versus negative control)

8.5. INTERPRETATION OF OBSERVATIONS

All the five provided test items were liquid, they were formulated in AOO. There were no confounding effects of significant systemic toxicity at any examined concentrations, although some local irritation was seen in case of Test Item B and D at 10% (w/v) concentration.

The summary of the results is shown in Table 7 and Figure 1.

In two cases, Test Item C (ipox EH 2240) and Test Item E (IPD-POLYMER DBC-15-01), the resulted stimulation index value were below the threshold limit of 3 at both examined concentrations, thus these materials gave a negative response in the study and were considered as having no skin sensitization potential (non-sensitizers).

The other three materials, Test Item A (Glycidyl 2-methylphenyl ether), Test Item B (Bis(3-aminopropyl)amine) and Test Item D (VESTAMIN IPD) had stimulation index values above the threshold limit (SI=3) at one or two concentrations, so they were considered as having skin sensitization potential (sensitizers). Test item A (Glycidyl 2-methylphenyl ether) had the strongest sensitization potential among these three test items as it showed a positive effect at both examined milestone concentrations (10 and 2% (w/v)), the calculated EC3 concentration was 1.6% for this test item. Test Item B (Bis(3-aminopropyl)amine) and Test Item D (VESTAMIN IPD) showed weaker sensitization potential, as they showed a positive effect at 10% (w/v) concentration, but negative result at 2% (w/v) concentration. The sensitization potential of these two test items was approximately the same (EC3 values of 3.9% (w/v) and 4.1% (w/v) for Test Items B and D, respectively), although the observed local effects at the 10% (w/v) concentration (especially in case of Test Item D) might influenced the calculated EC3 values).

The size of lymph nodes was in good correlation with this conclusion.

Table 7: Summary of Study Results

Test Group Name	Test item concentration (% w/v)	Mean body weight change (%)	Signs of Local Irritation	Group Stimulation index	EC3 value (% w/v)	EC3 value (mM)
Negative (vehicle) control (AOO)	--	0.9	-	1.0	--	--
Test Item A Glycidyl 2-methylphenyl ether (CAS 2210-79-9)	10	2.5	-	16.1	1.6	97.4
	2	2.0	-	4.7		
Test Item B Bis(3-aminopropyl)amine (CAS 56-18-8)	10	-3.3	+/-	4.3	3.9	297.2
	2	0.5	-	2.6		
Test Item C ipox EH 2240 (CAS 90530-16-8)	10	0.8	-	1.2	--	--
	2	2.7	-	0.5		
Test Item D VESTAMIN IPD (CAS 2855-13-2)	10	-0.9	+	7.9	4.1	240.8
	2	4.1	-	1.3		
Test Item E IPD-POLYMER DBC-15-01 (38294-64-3)	10	1.0	-	1.6	--	--
	2	6.1	-	0.8		
Positive control (25% (w/v) HCA in AOO)	--	1.2	+/-	5.3	--	--

Notes: In case of the local irritation, - means no signs of local irritation, +/- means that excessive local irritation was indicated for at least one (but not all) animal in the group; + means that excessive local irritation was observed for all animals in the group.

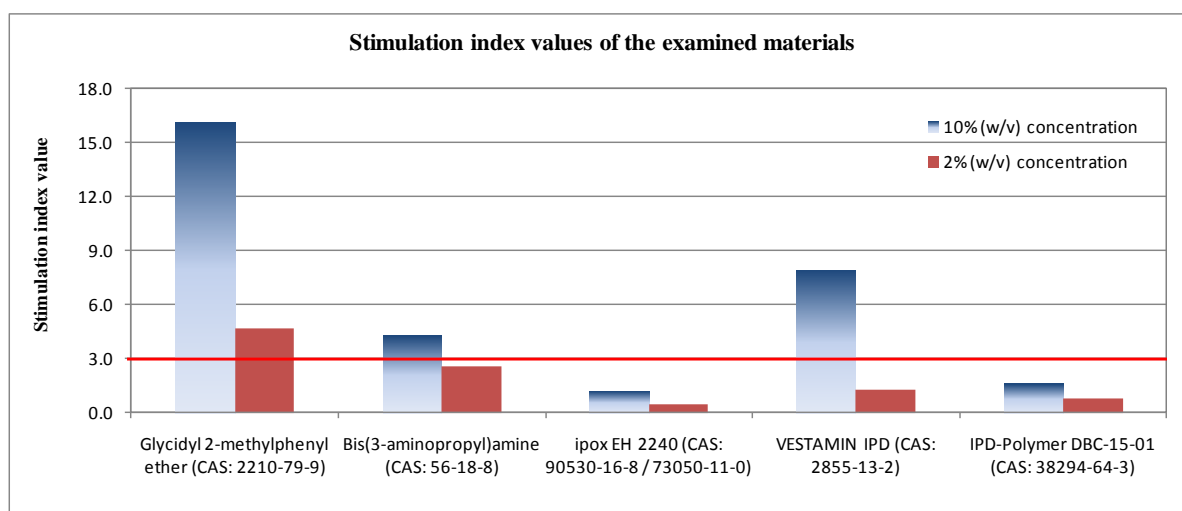


Figure 1: Test Item Stimulation Index Values

8.6. RELIABILITY OF THE TEST

The result of the positive control substance α -Hexylcinnamaldehyde (HCA) dissolved in the same vehicle was used to demonstrate the appropriate performance of the assay [1]. The positive control substance was examined at a concentration of 25% (w/v) in the relevant vehicle (AOO) using CBA/CaOlaHsd mice.

No mortality, cutaneous reactions or signs of toxicity were observed for the positive control substance in the study. A significant lymphoproliferative response (stimulation index value of 5.3) was noted for HCA in the main experiment. This value confirmed the appropriate performance of the assay.

The DPN values observed for the negative (vehicle) control group and positive control group in this experiment were in good correlation with the overall historical control data*. Historical control data for the positive and negative control substances are shown in Appendix 6.

*Note: The observed DPN value of the negative control substance was slightly higher than the historical control range for this vehicle in the CBA/CaOlaHsd strain; however, the data is in line with the most recent general control range for all vehicles. It is concluded that this study data was considered to be acceptable.

Each treated and control group included at least 4 animals.

The study was considered to be valid.

9. CONCLUSION

In conclusion, under the conditions of the present ranking study at fixed dose levels (where there was some irritation present in some cases), the sensitization potential of the test items was considered to be:

Glycidyl 2-methylphenyl ether (CAS No: 2210-79-9) > Bis(3-aminopropyl)amine (CAS No.: 56-18-8) ≈ VESTAMIN IPD (CAS No.: 2855-13-2).

ipox EH 2240 (CAS No.: 90530-16-8 / 73050-11-0) and IPD-POLYMER DBC-15-01 (CAS No.: 38294-64-3) were shown to have no sensitization potential (non-sensitizers) in this Local Lymph Node Assay.

10. DISTRIBUTION OF THE FINAL REPORT

Sponsor: 1x PDF file
Archive: 1x original, bound

11. REFERENCES

1. OECD Guidelines for Testing of Chemicals No.429, Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay (Adopted 22 July 2010)
2. Commission Regulation (EC) No. 440/2008 of 30 May 2008, B.42. Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay (Official Journal L 142, 31/05/2008)
3. Commission Regulation (EU) No 640/2012 of 6 July 2012 amending for the purpose of its adaptation to technical progress, Regulation (EC) No 440/2008 (Official Journal L 193, 20/07/2012)
4. Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (sixth revised edition), United Nations, New York and Geneva, 2015
5. Commission Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 (Official Journal L 353, 1-1355, 31/12/2008)
6. OECD Guidelines for Testing of Chemicals No.404, Acute Dermal Irritation / Corrosion (Adopted 28 July 2015)
7. Ryan C.A., Chaney J.G., Gerberick G.F., Kern P.S., Dearman R.J., Kimber I. & Basketter D.A., Extrapolating local lymph node assay EC3 values to estimate relative sensitizing potency, *Cutan. Ocul. Toxicol.* 26(2) (2007), 135-145
8. Gerberick G.F., Ryan C.A., Kern P.S., Dearman R.J., Kimber I., Patlewicz G.Y. & Basketter D.A., A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* 50 (2004), 274-288
9. Hungarian GLP Regulations: 42/2014. (VIII. 19.) EMMI decree of the Ministry of Human Capacities which corresponds to the OECD GLP, ENV/MC/CHEM (98)17

A P P E N D I C E S

APPENDIX 1**Study Schedule
(In life phase)**

	Relative Day	Absolute Day
PRE-EXPERIMENTAL PERIOD:		
Animal receipt:	Day (-14)	09 March 2016
Veterinary control and acclimatisation:	from Day (-14) to Day 1	09 March 2016 23 March 2016
Animal identification:	Day 1	23 March 2016
Randomisation:	Day 1	23 March 2016
EXPERIMENTAL PERIOD:		
Treatment days:	Day 1 Day 2 Day 3	23 March 2016 24 March 2016 25 March 2016
Body weight measurement:	Day 1 (beginning of the test) and Day 6 (prior to ³ HTdR injection)	23 March 2016 and 28 March 2016
Clinical observation:	daily from Day 1 to Day 6	23 March 2016 and 28 March 2016
Injection of ³ HTdR:	Day 6	28 March 2016
Preparation of LNC:	Day 6	28 March 2016
Sample measurement:	Days 7-10	29 March – 01 April 2016

APPENDIX 2

Copies of the Test Item Identification Documents

Test Item A

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

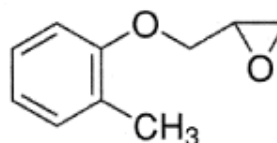
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:

Glycidyl 2-methylphenyl ether - technical grade, 90%

Product Number: 340146
 Batch Number: MKBP7140V
 Brand: ALDRICH
 CAS Number: 2210-79-9
 MDL Number: MFCD00037847
 Formula: C₁₀H₁₂O₂
 Formula Weight: 164.2 g/mol
 Quality Release Date: 12 JUL 2013



Expiry Date: 31 Jan 2017 (1 year from received date)
 in 2016 Jan. 12.

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (GC)	> 89.0 %	91.3 %

Jamie Gleason, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, Wisconsin US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

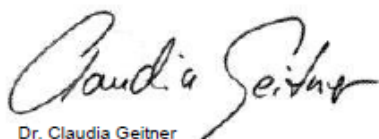
Test Item B

SIGMA-ALDRICH®3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sigmaaldrich.com Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Certificate of Analysis

Product Name: BIS(3-AMINOPROPYL)AMINE
98 %
Product Number: I1006
Batch Number: BCBN2364V
Brand: Aldrich
CAS Number: 56-18-8
Formula: (NH₂CH₂CH₂CH₂)₂NH
Formula Weight: 131.22
Quality Release Date: 18 JUN 2014
Recommended Retest Date: MAY 2020

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS	COLORLESS
APPEARANCE (FORM)	LIQUID	LIQUID
TITRATION (T) HCL 1M	97.5 % - 102.5 %	100.2 %
PURITY (GC AREA %)	≥ 97.5 %	99.5 %
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Test Item C



Analysenzertifikat

Produktname : **ipox EH 2240**
Chargen-Nr. : 00238201
Haltbarkeitsdatum : 11.02.2017
Lieferdatum : 12.02.2016
Liefermenge : 1,00 KG 1 Flasche
Bestellnummer : Mustersendung
Lieferscheinnummer : 3606

Spezifikation	Sollwert min.	Sollwert max.	Istwert	Einheit	geprüft nach
Aminzahl	470	500	487	mgKOH/g	ipox 003
Viskosität bei 25°C	120	220	145	mPa*s	ipox 010
Brechungsindex (25°C)	1,5380	1,5420	1,5388	-	ipox 016
Farbzahl nach Gardner		4,0	0,5	-	EN 1557
Farbzahl nach Hazen		100	80	-	EN 1557
Wassergehalt		0,50	0,16	%	KF Coulometric

25.02.2016

Dieses Zertifikat wurde nach bestem Wissen im Rahmen unseres Qualitätssicherungssystems erstellt. Es entbindet unsere Kunden keinesfalls von Ihrer Verpflichtung, eine eigene Qualitätskontrolle und Eignungsprüfung durchzuführen. Diese Verpflichtung gilt ausdrücklich auch für alle Dritten, an die das Zertifikat weitergereicht wird. Mit dem Zertifikat ist keinerlei weitere Zusicherung verbunden, es ist ohne Unterschrift gültig.

Test Item D



Seite 1 von 1

Evonik Resource Efficiency GmbH, 45764 Marl

Produkt VESTAMIN® IPD
BULK

Material

Menge

**Werkszeugnis 2.2
nach EN 10204**

Datum

Lieferungsnummer / Position

Datum

Auftragsnummer / Position

Datum

Crosslinkers

Kontaktperson

Telefon

Telefax

E-Mail

Kundennummer

Ihre Bestellung

Datum

Charge: TWP – 12.01.16

Prüfmerkmal	Prüfmethode	Maßeinheit	Ergebnis	Sollwert	Min	Max
Aussehen	visuell		klar			
Hazen-Farbzahl	DIN EN ISO 6271-2		3			15
Wasser	Karl-Fischer (AA 005)	%	0,01			0,24
sek./tert. Aminoverbdg. (IPD)	GC-SAA 1604/35	%	0,02			0,14
Isophorondiarnin	GC-SAA 1604/35	%	99,9		99,7	
Summe IPD-Aminonitril	GC-SAA 1604/35	%	0,08			0,14

***SAA: Standard-Arbeitsanweisung**

Hiermit bestätigen wir anhand obiger Ergebnisse der laufenden betrieblichen Prüfungen, dass die Lieferung den Vereinbarungen bei der Bestellanahme entspricht.

Analytik Herne / Witten

Dieses Zertifikat wurde sorgfältig und nach bestem Wissen im Rahmen unseres Qualitätssicherungssystems erstellt. Es entbindet unsere Kunden jedoch nicht von Ihrer Obliegenheit zur Wareneingangskontrolle und begründet keine Ansprüche Dritter, an die es weitergeleitet wird. Eine Eigenschaftszusicherung im rechtlichen Sinne ist hiermit nicht verbunden. Dieses Zertifikat ist ohne Unterschrift gültig.

*** Ende ***

Test Item E

CONFIDENTIAL

Page No.: 1/2

CiToxLAB Hungary Ltd. TEST ITEM DATA SHEET



This questionnaire allows us to safely store, handle and properly administer your test substance. All data will be treated as strictly confidential. Please also send a certificate of analysis and material safety data sheet if available.			
1. SPONSOR (as defined by GLP)			
SPONSOR		MANUFACTURER (if different)	
Company *	Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG)	Company *	MC-Bauchemie Müller GmbH & Co. KG
Address *	Klarastraße 63, 79106 Freiburg	Address *	Am Kruppwald 1-8, 46238 Bottrop
Contact Person *	Dr. Karin Heine	Contact Person *	Dr. Wolfgang Karl
Telephone		Telephone	+49(0)2041-101-256
Fax Number		Fax Number	
E-mail *	karin.heine@fobig.de	E-mail *	wolfgang.karl@mc-bauchemie.de
2. TEST ITEM INFORMATIONS			
Test Item Name * (please use the name should be appeared in study report)	Oligomerisierter Härter (IPD-Polymer DBC-15-01)		
Substance Classification *	<input type="checkbox"/> Pharmaceutical <input checked="" type="checkbox"/> Industrial Chemical <input type="checkbox"/> Agrochemical <input type="checkbox"/> Other		
Chemical Name * (IUPAC, CAS or synonym)	(CAS 38294-64-3)4,4'-Isopropylidendiphenol, Oligomer mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan und 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin		
Batch (Lot) Number *	Go 5319		
Manufacture date * (day-month-year)	17.09.2015	Expiry (Retest) date * (day-month-year)	17.09.2016
Molecular Weight (if applicable)		CAS number (if available)	
Molecular Formula (if applicable)		Quantity * (sent by Sponsor)	50 g
Structural Formula (if applicable)			
Purity * (otherwise treated as 100%)	Mixture of 50% benzyl alcohol, 5-10% 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin (IPD) and 38-44% oligomer based on IPD		
Composition/Ingredients (if applicable)	benzyl alcohol, 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin (IPD), oligomer		

* = mandatory fields

CONFIDENTIAL

Page No.: 2/2

3. PHYSICAL PROPERTIES, STABILITY AND SOLUBILITY INFORMATION			
Colour *	yellow	Appearance * (at Room Temperature)	liquid
Other known parameters (e.g. density, pH value, melting point, boiling point, hygroscopic properties)			
Known analytical methods			
Solubility properties (please mark with X if test item soluble in listed solvents)	<input type="checkbox"/> Water	<input type="checkbox"/> 1% Aq. Carboxymethyl cellulose	<input type="checkbox"/> Acetone <input type="checkbox"/> DMSO
	<input type="checkbox"/> Etanol	<input type="checkbox"/> Propylene glycol	<input type="checkbox"/> Olive oil <input type="checkbox"/> Acetonitrile <input type="checkbox"/> DMF
	<input type="checkbox"/> Unknown <input type="checkbox"/> Other:		
4. HAZARDS INFORMATION (if no MSDS available)			
<input type="checkbox"/> Explosive	<input type="checkbox"/> Oxidizing	<input type="checkbox"/> Flammable	<input type="checkbox"/> Toxic <input type="checkbox"/> Dangerous for the environment
<input type="checkbox"/> Corrosive	<input type="checkbox"/> Harmful	<input type="checkbox"/> Irritant	<input type="checkbox"/> Unknown <input type="checkbox"/> Other:
5. STORAGE (recommended conditions for storage over prolonged periods of time)			
Storage conditions * (please mark with X) If no information provided, substance will be stored at controlled room temperature in a dark storeroom.	X Controlled Room Temperature (15-25°C, below 70 RH%)		
	<input type="checkbox"/> Refrigerator (2-8°C)	<input type="checkbox"/> Freezer (\leq 15°C)	<input type="checkbox"/> Ultra Freezer (\leq -70°C)
	<input type="checkbox"/> Protected from light	<input type="checkbox"/> Protected from humidity	<input type="checkbox"/> Under inert gas
	<input type="checkbox"/> Other, specified here:		
6. DISPOSAL (if no information provided, test item will be disposed after finalisation of all studies)			
Remaining Test item * (please mark with X)	X Dispose (after finalisation of all studies or 3 months after sending the draft reports)		
	<input type="checkbox"/> Return (sample will be returned as "sample without value")		
<p>CiToxLAB Hungary Ltd. will retain a reference sample per test item. Returning test item will be at the expense of the Sponsor. Standard freight charges available on request. If additional charges are applicable the Sponsor's agreement will be obtained prior to dispatch. Test item will be send back after sending out the final report(s).</p>			
General Remarks			
Signature of Sponsor *	i. A. 		Date 23-12-2015 (day-month-year)

* = mandatory fields

Delivery Address:

Pharmacy Department
 CiToxLAB Hungary Ltd.
 H-8200 Veszprem, Szabadsagpuszta,
 HUNGARY
 Phone: +36 88 545 300
 Fax: +36 88 545 301
 E-mail: dispensary@hu.citoxlab.com

APPENDIX 3

Content of the Diet

S8106-S011
SM Rat/Mouse - Breeding & Maintenance, 15 mm, autoclavable
Complete diet for rats/mice - Breeding & Maintenance
(For laboratory animals only)

Analytical constituents

Crude protein	18,00 %
Crude oils and fats	3,50 %
Crude fiber	3,60 %
Crude ash	6,50 %
Calcium	1,00 %
Phosphorus	0,70 %
Lysine	1,10 %
Met+Cys	0,89 %
ME pig	13,4 MJ/kg

Batch
540 5117
Best before
07 2016
Net weight
25,0 kg
α NL 96093

Nutritional Additives

E672	Vitamin A	25.000 IU, IE/kg
E671	Vitamin D ₃	1.500 IU, IE/kg
	Vitamin E (dl-α-tocopherol-acetat)	125 mg/kg
E1 Fe	Ferrous sulphate monohydrate	100 mg/kg
E4 Cu	Copper (II)-sulfate pentahydrate	5 mg/kg
E5 Zn	Zinc sulphate monohydrate	50 mg/kg
E5 Mn	Manganous-(II)-sulphate monohydrate	30 mg/kg
E8 Se	Sodium selenite	0,1 mg/kg
E2 I	Calcium iodate anhydrous	2,0 mg/kg

Composition:

Wheat and wheat by-products, soybean meal, barley, minerals, vegetable oils.

That compound feedingstuff contains genetically modified soybean and corn products.

Manufacturer and/or Distributor / Hersteller und/oder Vertrieb: ssniff
Spezialdiäten GmbH, Ferdinand-Gabriel-Weg 16, DE-59494 Soest,
mail@ssniff.de

Remark: Best before date requires appropriate storage (particularly hygienic, cool and dry)

APPENDIX 4

Summarized Clinical Observations

Table 8: Summarized Clinical Observations

Group	Animal No.	CLINICAL OBSERVATIONS					
		DAY 1	DAY 2	DAY 3	DAY 4	DAY 5	DAY 6
Negative (vehicle) control (AOO)	1	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	2	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	3	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	4	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
Glycidyl 2-methylphenyl ether (10% (w/v) in AOO)	5	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	6	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	7	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	8	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
Glycidyl 2-methylphenyl ether (2% (w/v) in AOO)	9	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	10	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	11	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	12	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free

Notes:

1. BT: before treatment, AT: after treatment
2. ES: Erythema score (in all those cases were no data are shown, ES=0)

Table 8: Summarized Clinical Observations (continued)

Group	Animal No.	CLINICAL OBSERVATIONS					
		DAY 1	DAY 2	DAY 3	DAY 4	DAY 5	DAY 6
Bis(3-aminopropyl) amine (10% (w/v) in AOO)	13	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: alopecia AT: alopecia, ES: 1	Alopecia, slightly fixed ears, ES:1	Alopecia, ES:1	Alopecia
	14	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: ES: 1	Slightly fixed ears, ES:1	Alopecia, ES:1	Alopecia
	15	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: ES: 1	Slightly fixed ears, ES:1	Slightly fixed ears, ES:1	Slightly fixed ears
	16	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free, ES: 1	Slightly fixed ears, ES:1	Alopecia, ES:1	Alopecia
Bis(3-aminopropyl) amine (2% (w/v) in AOO)	17	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	ES:1	Alopecia	Alopecia
	18	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	19	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	20	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Alopecia	Alopecia
ipox EH 2240 (10% (w/v) in AOO)	21	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	22	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	23	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	24	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free

Notes:

1. BT: before treatment, AT: after treatment
2. ES: Erythema score (in all those cases where no data are shown, ES=0)

Table 8: Summarized Clinical Observations (continued)

Group	Animal No.	CLINICAL OBSERVATIONS					
		DAY 1	DAY 2	DAY 3	DAY 4	DAY 5	DAY 6
ipox EH 2240 (2% (w/v) in AOO)	25	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	26	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	27	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	28	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
VESTAMIN IPD (10% (w/v) in AOO)	29	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Wound, ES:1	Wound, slightly fixed ears, ES:1	Wound, slightly fixed ears
	30	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Wound, ES:1	Wound, slightly fixed ears, ES:1	Wound, slightly fixed ears
	31	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Wound, ES:1	Wound, slightly fixed ears, ES:1	Wound, slightly fixed ears
	32	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Wound, ES:1	Wound, slightly fixed ears, ES:1	Wound, slightly fixed ears
VESTAMIN IPD (2% (w/v) in AOO)	33	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	34	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	35	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	ES:1	Symptom-free	Symptom-free
	36	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free

Notes:

1. BT: before treatment, AT: after treatment
2. ES: Erythema score (in all those cases were no data are shown, ES=0)
3. Wound: Minor wound near the ear.

Table 8: Summarized Clinical Observations (continued)

Group	Animal No.	CLINICAL OBSERVATIONS					
		DAY 1	DAY 2	DAY 3	DAY 4	DAY 5	DAY 6
IPD-POLYMER DBC-15-01 (10% (w/v) in AOO)	37	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	38	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	39	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	40	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
IPD-POLYMER DBC-15-01 (2% (w/v) in AOO)	41	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	42	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	43	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	44	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
Negative (vehicle) control (AOO)	45	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	46	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	47	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	48	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free

Notes:

1. BT: before treatment, AT: after treatment
2. ES: Erythema score (in all those cases were no data are shown, ES=0)

Table 8: Summarized Clinical Observations (continued)

Group	Animal No.	CLINICAL OBSERVATIONS					
		DAY 1	DAY 2	DAY 3	DAY 4	DAY 5	DAY 6
Positive control (25% (w/v) HCA in AOO)	49	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	50	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	51	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free
	52	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	BT: symptom-free AT: symptom-free	Symptom-free	Symptom-free	Symptom-free

Notes:

1. BT: before treatment, AT: after treatment
2. ES: Erythema score (in all those cases where no data are shown, ES=0)

APPENDIX 5

Ear Thickness Measurements

Table 9: Individual Ear Thickness for all Animals

Animal Number	Test Group Name	Ear Thickness on Day 1 (mm)		Ear Thickness on Day 3 (mm) and change (%)		Ear Thickness on Day 6 (mm) and change (%)		Biopsy weight* on Day 6 (mg)
		Right	Left	Right	Left	Right	Left	
1	Negative (vehicle) control (AOO)	0.21	0.20	0.21 (0.0)	0.20 (0.0)	0.21 (0.0)	0.21 (5.0)	14.1
2		0.20	0.20	0.20 (0.0)	0.21 (5.0)	0.21 (5.0)	0.21 (5.0)	14.3
3		0.20	0.20	0.21 (5.0)	0.21 (5.0)	0.21 (5.0)	0.20 (0.0)	14.9
4		0.21	0.21	0.22 (4.8)	0.21 (0.0)	0.21 (0.0)	0.21 (0.0)	14.8
45		0.20	0.21	0.21 (5.0)	0.22 (4.8)	0.23 (15.0)	0.23 (9.5)	15.0
46		0.21	0.22	0.21 (0.0)	0.22 (0.0)	0.22 (4.8)	0.21 (-4.5)	16.1
47		0.20	0.20	0.21 (5.0)	0.21 (5.0)	0.22 (10.0)	0.23 (15.0)	15.1
48		0.21	0.21	0.21 (0.0)	0.21 (0.0)	0.21 (0.0)	0.21 (0.0)	15.2
5		Glycidyl 2-methylphenyl ether (10% (w/v) in AOO)	0.21	0.20	0.23 (9.5)	0.24 (20.0)	0.25 (19.0)	0.24 (20.0)
6	0.20		0.20	0.24 (20.0)	0.24 (20.0)	0.24 (20.0)	0.25 (25.0)	18.2
7	0.21		0.21	0.23 (9.5)	0.23 (9.5)	0.25 (19.0)	0.25 (19.0)	16.6
8	0.21		0.20	0.23 (9.5)	0.24 (20.0)	0.24 (14.3)	0.25 (25.0)	17.3
9	Glycidyl 2-methylphenyl ether (2% (w/v) in AOO)	0.21	0.22	0.21 (0.0)	0.22 (0.0)	0.22 (4.8)	0.23 (4.5)	14.3
10		0.20	0.20	0.23 (15.0)	0.21 (5.0)	0.22 (10.0)	0.22 (10.0)	14.5
11		0.21	0.21	0.21 (0.0)	0.22 (4.8)	0.22 (4.8)	0.22 (4.8)	15.6
12		0.21	0.20	0.23 (9.5)	0.22 (10.0)	0.22 (4.8)	0.23 (15.0)	14.3

Note:

- *: General historical control range: 11.92-22.53 mg. Irritant response is considered at over 28.16 mg ($\geq 25\%$ above the historical control maximum value).

Table 9: Individual Ear Thickness for all Animals (continued)

Animal Number	Test Group Name	Ear Thickness on Day 1 (mm)		Ear Thickness on Day 3 (mm) and change (%)		Ear Thickness on Day 6 (mm) and change (%)		Biopsy weight* on Day 6 (mg)
		Right	Left	Right	Left	Right	Left	
13	Bis(3-aminopropyl) amine (10% (w/v) in AOO)	0.22	0.21	0.24 (9.1)	0.27 (28.6)	0.27 (22.7)	0.29 (38.1)	18.6
14		0.21	0.21	0.23 (9.5)	0.25 (19.0)	0.28 (33.3)	0.28 (33.3)	18.7
15		0.21	0.20	0.24 (14.3)	0.25 (25.0)	0.27 (28.6)	0.28 (40.0)	18.4
16		0.21	0.21	0.25 (19.0)	0.26 (23.8)	0.26 (23.8)	0.26 (23.8)	20.1
17	Bis(3-aminopropyl) amine (2% (w/v) in AOO)	0.20	0.21	0.22 (10.0)	0.23 (9.5)	0.23 (15.0)	0.24 (14.3)	19.2
18		0.20	0.20	0.22 (10.0)	0.23 (15.0)	0.24 (20.0)	0.22 (10.0)	19.8
19		0.20	0.20	0.22 (10.0)	0.23 (15.0)	0.24 (20.0)	0.23 (15.0)	18.7
20		0.20	0.20	0.23 (15.0)	0.24 (20.0)	0.23 (15.0)	0.23 (15.0)	18.4
21	ipox EH 2240 (10% (w/v) in AOO)	0.21	0.20	0.23 (9.5)	0.23 (15.0)	0.22 (4.8)	0.22 (10.0)	16.0
22		0.21	0.21	0.22 (4.8)	0.22 (4.8)	0.23 (9.5)	0.23 (9.5)	17.4
23		0.22	0.20	0.22 (0.0)	0.23 (15.0)	0.22 (0.0)	0.23 (15.0)	16.0
24		0.20	0.21	0.23 (15.0)	0.24 (14.3)	0.23 (15.0)	0.23 (9.5)	15.6
25	ipox EH 2240 (2% (w/v) in AOO)	0.20	0.20	0.21 (5.0)	0.20 (0.0)	0.21 (5.0)	0.21 (5.0)	15.0
26		0.20	0.21	0.21 (5.0)	0.22 (4.8)	0.22 (10.0)	0.23 (9.5)	14.6
27		0.21	0.20	0.21 (0.0)	0.20 (0.0)	0.22 (4.8)	0.23 (15.0)	14.5
28		0.21	0.21	0.21 (0.0)	0.22 (4.8)	0.22 (4.8)	0.24 (14.3)	14.8

Note:

- *: General historical control range for biopsy weights is 11.92-22.53 mg. Irritant response is considered at over 28.16 mg ($\geq 25\%$ above the historical control maximum value).

Table 9: Individual Ear Thickness for all Animals (continued)

Animal Number	Test Group Name	Ear Thickness on Day 1 (mm)		Ear Thickness on Day 3 (mm) and change (%)		Ear Thickness on Day 6 (mm) and change (%)		Biopsy weight* on Day 6 (mg)
		Right	Left	Right	Left	Right	Left	
29	VESTAMIN IPD (10% (w/v) in AOO)	0.21	0.21	0.23 (9.5)	0.24 (14.3)	0.36 (71.4)	0.28 (33.3)	26.0
30		0.21	0.20	0.23 (9.5)	0.23 (15.0)	0.28 (33.3)	0.37 (85.0)	25.0
31		0.21	0.21	0.23 (9.5)	0.22 (4.8)	0.30 (42.9)	0.29 (38.1)	20.5
32		0.20	0.21	0.22 (10.0)	0.21 (0.0)	0.31 (55.0)	0.29 (38.1)	22.6
33	VESTAMIN IPD (2% (w/v) in AOO)	0.22	0.21	0.22 (0.0)	0.22 (4.8)	0.23 (4.5)	0.24 (14.3)	15.9
34		0.20	0.20	0.21 (5.0)	0.21 (5.0)	0.22 (10.0)	0.24 (20.0)	16.0
35		0.21	0.20	0.21 (0.0)	0.21 (5.0)	0.22 (4.8)	0.22 (10.0)	16.8
36		0.20	0.20	0.21 (5.0)	0.22 (10.0)	0.22 (10.0)	0.23 (15.0)	15.0
37	IPD-POLYMER DBC-15-01 (10% (w/v) in AOO)	0.22	0.21	0.23 (4.5)	0.24 (14.3)	0.23 (4.5)	0.22 (4.8)	15.1
38		0.20	0.20	0.22 (10.0)	0.24 (20.0)	0.23 (15.0)	0.24 (20.0)	15.2
39		0.21	0.20	0.23 (9.5)	0.23 (15.0)	0.24 (14.3)	0.25 (25.0)	16.2
40		0.20	0.21	0.23 (15.0)	0.24 (14.3)	0.24 (20.0)	0.23 (9.5)	16.2
41	IPD-POLYMER DBC-15-01 (2% (w/v) in AOO)	0.21	0.21	0.23 (9.5)	0.23 (9.5)	0.22 (4.8)	0.22 (4.8)	15.6
42		0.20	0.20	0.22 (10.0)	0.22 (10.0)	0.24 (20.0)	0.23 (15.0)	16.0
43		0.21	0.21	0.23 (9.5)	0.22 (4.8)	0.23 (9.5)	0.23 (9.5)	15.7
44		0.21	0.20	0.23 (9.5)	0.22 (10.0)	0.22 (4.8)	0.23 (15.0)	15.1

Note:

- *: General historical control range for biopsy weight is 11.92-22.53 mg. Irritant response is considered at over 28.16 mg ($\geq 25\%$ above the historical control maximum value).

Table 9: Individual Ear Thickness for all Animals (continued)

Animal Number	Test Group Name	Ear Thickness on Day 1 (mm)		Ear Thickness on Day 3 (mm) and change (%)		Ear Thickness on Day 6 (mm) and change (%)		Biopsy weight* on Day 6 (mg)
		Right	Left	Right	Left	Right	Left	
49	Positive control (25% (w/v) HCA in AOO)	0.21	0.21	0.24 (14.3)	0.25 (19.0)	0.26 (23.8)	0.25 (19.0)	17.8
50		0.21	0.21	0.24 (14.3)	0.25 (19.0)	0.26 (23.8)	0.26 (23.8)	16.3
51		0.20	0.21	0.25 (25.0)	0.24 (14.3)	0.25 (25.0)	0.26 (23.8)	16.6
52		0.21	0.20	0.25 (19.0)	0.26 (30.0)	0.27 (28.6)	0.27 (35.0)	16.9

Note:

- *: General historical control range for biopsy weight is 11.92-22.53 mg. Irritant response is considered at over 28.16 mg ($\geq 25\%$ above the historical control maximum value).

APPENDIX 6

Historical Control Data

Table 10: Historical Control Data of the Positive and Negative Controls (2008-2015)

Strain: CBA/J Rj (Years 2008-2014)						
	Vehicles					
	Acetone : Olive oil 4:1 (AOO)			1% Pluronic PE9200 in water		
	DPN values		SI value	DPN values		SI value
	Control	HCA 25%	HCA 25%	Control	HCA 25%	HCA 25%
<i>Average</i>	162.3	1627.0	11.7	117.0	931.2	8.6
<i>Range:</i> <i>min</i>	36.4	304.9	3.2	21.4	146.3	1.8
	<i>max</i>	586.9	4602.1	52.7	469.6	6258.1
<i>Number of cases</i>	106	81	81	127	84	84

	Vehicles					
	<i>N,N</i> -Dimethylformamide (DMF)			Dimethyl sulfoxide (DMSO)		
	DPN values		SI value	DPN values		SI value
	Control	HCA 25%	HCA 25%	Control	HCA 25%	HCA 25%
<i>Average</i>	165.6	2484.6	14.7	210.0	2278.2	11.2
<i>Range:</i> <i>min</i>	20.8	350.9	3.8	80.6	848.2	4.8
	<i>max</i>	1843.0	28287.0	75.7	424.3	5441.2
<i>Number of cases</i>	90	56	56	28	20	20

	Vehicles					
	Propylene glycol (PG)			Methyl ethyl ketone (MEK)		
	DPN values		SI value	DPN values		SI value
	Control	HCA 25%	HCA 25%	Control	HCA 25%	HCA 25%
<i>Average</i>	120.7	1488.1	13.4	203.9	2525.5	14.0
<i>Range:</i> <i>min</i>	38.4	510.4	3.7	72.2	412.6	4.4
	<i>max</i>	288.8	3231.3	27.9	572.2	4056.4
<i>Number of cases</i>	22	21	21	11	9	9

HCA = α -Hexylcinnamaldehyde

SI (Stimulation Index) = DPN of a treated group divided by DPN of the appropriate control group.

DPN (Disintegrations Per Node) = DPM (Disintegrations Per Minute) divided by the number of lymph nodes.

In case of individual approach, SI values were calculated from the mean DPN values of the group.

Table 10: Historical Control Data of the Positive and Negative Controls (2008-2015)
(continued)

Strain: CBA/CaOlaHsd (Years 2014-2015)						
	Vehicles					
	Acetone : Olive oil 4:1 (AOO)			1% Pluronic PE9200 in water		
	DPN values		SI value	DPN values		SI value
	Control	HCA 25%	HCA 25%	Control	HCA 25%	HCA 25%
<i>Average</i>	415.2	2922.6	7.5	197.7	1825.3	10.0
<i>Range:</i> <i>min</i>	111.3	890.3	3.3	23.0	154.0	3.0
	<i>max</i>	847.8	7674.5	15.5	680.8	6755.8
<i>Number of cases</i>	32	32	30	134	134	128

	Vehicles					
	<i>N,N</i> -Dimethylformamide (DMF)			Dimethyl sulfoxide (DMSO)		
	DPN values		SI value	DPN values		SI value
	Control	HCA 25%	HCA 25%	Control	HCA 25%	HCA 25%
<i>Average</i>	244.6	2522.6	10.8	488.7	3212.1	7.8
<i>Range:</i> <i>min</i>	140.8	1201.3	6.3	238.5	2017.2	3.1
	<i>max</i>	505.8	4804.6	21.3	934.6	4877.5
<i>Number of cases</i>	21	21	21	13	13	12

	Vehicles					
	Propylene glycol (PG)			Methyl ethyl ketone (MEK)		
	DPN values		SI value	DPN values		SI value
	Control	HCA 25%	HCA 25%	Control	HCA 25%	HCA 25%
<i>Average</i>	235.4	2371.8	10.0	260.2	4888.8	19.5
<i>Range:</i> <i>min</i>	63.3	817.3	6.5	183.5	2456.3	8.9
	<i>max</i>	506.0	4978.0	14.4	383.3	8682.5
<i>Number of cases</i>	14	14	14	9	10	10

HCA = α -Hexylcinnamaldehyde

SI (Stimulation Index) = DPN of a treated group divided by DPN of the appropriate control group.

DPN (Disintegrations Per Node) = DPM (Disintegrations Per Minute) divided by the number of lymph nodes.

In case of individual approach, SI values were calculated from the mean DPN values of the group.

APPENDIX 7

Copy of the GLP Certificate



H-1051 Budapest, Zrínyi u. 3.
1372 P.O. Box:450.
Tel: +36 1 88 69-300, Fax: +36 1 88 69 460
E-mail: ogyei@ogyei.gov.hu, Web: www.ogyei.gov.hu

Ref. no: OGYI/19440-7/2015

Admin.: Szatmári Andrea

Date: 22 September, 2015

**GOOD LABORATORY PRACTICE (GLP)
CERTIFICATE**

It is hereby certified that the test facility

CiToxLAB Hungary Ltd.

H-8200 Veszprém, Szabadságpuszta

is able to carry out

*physico-chemical testing, toxicity studies, in vitro studies and mutagenicity studies,
environmental toxicity studies on aquatic or terrestrial organisms, studies on behaviour in
water, soil and air; bio-accumulation, reproduction toxicology, inhalation toxicology,
analytical chemistry and contract archiving*

in compliance with the Principles of GLP (Good Laboratory Practice) and also complies with
the corresponding OECD/European Community requirements.

Date of the inspection: **02-04. June 2015.**


Dr. József Reiter
Deputy Director-General

ANHANG 6 – EINGANGSDATEN FÜR DIE ITS-3 MODELLIERUNG

Chemical	Cas.#	Smiles	LLNA	%	DPRACys	DPRALys	KEC1.5	KEC3	IC50
Bisphenol A-Harze	25068-38-6	c1(C(C)C)c2ccc(O)cc2ccc(O)cc1.C1C@H(O)C1		5,70					
Reaktionsprodukt Bisphenol A, Epichlorhydrin	25085-99-8	O1C@H(CO)C2ccc(Cc3ccc(O)cc3)C(C)C2C1							
Bisphenol-A-Epichlorhydrin MW 340	1675-54-3	C1c2ccc(cc1)OC(CO)1(c1ccc(cc1)OCC1CO)C(C)		1,5	57,50	98,90	5		22
Bisphenol F-Harze	8003-36-5	C1OC(C)C1C@H(O)C1C=C		1,13			7		23
4,4'-Diaminodiphenylmethan	101-77-9	c1(Cc2ccc(N)cc2)ccc(N)cc1							
Ethylendiamin (1,2-Diaminethan, auch als Hydrochlorid)	107-15-3	C(C)N		2,5	81,4	99,3	99,9	453,4	2000
Ethylendiamin	107-15-3	C(C)N					489	1004,7	1532,5
Diethylentriamin (2,2'-iminodi(ethylamine))	111-40-0	N(CCN)CCN		3,9	55,2	98,1	1259,4		0
Diethylentriamin	111-40-0	N(CCN)CCN							3146,1
Dipropylentriamin	56-18-8	N(CCN)CCN		3,9			356		3048,31
Trimethylhexamethylendiamin (TMD, TMDA)	25620-58-0	C1(C@H)(CCCN)C(N)C(C)		1,9					987,1
Triethylentriamin	112-24-3	C1CNCCNCCN							1852,7
N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan (Dimethylaminopropylamine)	109-55-7	CN(C)CCN		2,2	90	100	85,76	472,42	1337,9
N,N-Dimethyl-1,3-diaminopropan	109-55-7	CN(C)CCN							1410,9
Tetraethylenpentaamin	112-67-2	N(CCNCCN)CCNCCN							43,3
Pentaethylenhexamin (3,6,9,12-tetraazatetradecamethylenediamine)	4067-16-7	C1CNCCNCCNCCNCCN							
4,4'-Diaminocyclohexylmethan (4,4'-Methylen-bis(cyclohexylamin))	1761-71-3	C1CC2CC(N)CC2CC(C)N1							290,1
Bis[4-(1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethylamino)-3-methyl-cyclohexyl]methane	136210-32-7	N(C@H)(CC(=O)OCC)C(=O)OCC C@H1CC(C@H)C(C@H)1C(C)C@H1CC(C@H)N(C@H)(CC(=O)OCC)C(=O)OCC C@H1C(C)C@H1							
N-Aminoethylpiperazin, 2-Piperazin-1-ylamin	140-31-8	N1CCNCC1CCN					124,3		2260,8
Isophorondiamin (IPD), 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin	2855-13-2	C1C@H(C)C(C@H)(N)CC1(C)C(C)C		4,1			82,3	132,4	533,4
3-Cyclohexyl-aminopropylamin	3312-60-5	C1(NCCCN)CCCC1							
1,2-Diaminocyclohexan (DCH)	894-83-7	C1(C@H)(C@H)(C@H)(C)N1N		0,4					
N-cyanethylieres Trimethylhexamethylendiamin 3-((6-m-Xylidendiamin (Xylidendiamin, MXDA)	93941-62-9	C1CN(C)C(C@H)(CCCCN)C(C)C#N					414,4		913,1
1,4-Diaminobenzol	1477-55-0	C1=CC=C(N)CC=C1		0,4					
N-(2-Aminoethyl)-3-amino-propyltrimethoxysilan	1760-24-3	[Si](CCNCCN)(OC)OC		13					1798,6
1,10-Diamino-4,7-dioxadecan (Polyoxalkylamin)	2997-01-5	O(COCCCN)CCN					129,2		2268,8
Phthalsäureanhydrid	85-44-9	C1=CC(=O)OC1=O		0,16	83,3	68,7	2000	2000	2000
Tetrahydrophthalsäureanhydrid	85-43-8	C1(C@H)C(C@H)C(=O)O1							
Hexahydrophthalsäureanhydrid	85-42-7	O1C(C@H)C(C@H)C(C@H)C(=O)O1		0,84	84,3	65,4	2000	2000	2000
Methyltetrahydrophthalsäureanhydrid	11070-44-3	C1(OC)C(C@H)C(CCC(=O)O)C(=O)O1							
Methylhexahydrophthalsäureanhydrid	25550-51-0	C1(OC)C(C@H)C(CCC(=O)O)C(C@H)C(=O)O1							
tert-Butylphenol	98-54-4	C1C(C)C(C)C1C							
Bisphenol A	80-05-7	C1(C)C(C)C(C)C1C							
Butyl-glycidylether	2426-08-6	C1(C)C(C)C(C)C1C							
1,4-Butandiol-diglycidylether	2425-79-8	C1(C)C(C)C(C)C1C		28	32,7	88,5	218,5	381,6	0
Neopentylglykol-diglycidylether	17557-23-2	C1(C)C(C)C(C)C1C							
2-Ethylhexylglycidylether	2461-15-6	C1(C)C(C)C(C)C1C							
1,6-Hexandiol-diglycidylether	16096-31-4	O1C(C@H)1C(C)C(C)C(C)C1		1,9	16,11	84,06	16,91		209,61
Versäicureglycidylester (z. B. Cardura E 10) 2,3-Epoxypropyl neodecanat	26761-45-5	C1(C)C(C)C(C)C1C							
Trimethylolpropan-triglycidylether	30499-70-8	O1C(C@H)1C(C)C(C)C(C)C1		1,4	11,81	82,33	19,89		93,89
C12/C14-Monoglycidylether	68609-97-2	C1(C)C(C)C(C)C1C		0,6	95,16	102,41	10,6		51,5
Polypropylene glycol chloromethylloxiran polymer	9072-62-2	C1CO1							
Dipropylene glycol diglycidyl ether	41638-13-5	O1C(C@H)1C(C)C(C)C(C)C1							
Cyclohexandimethanol-diglycidylether	14228-73-0	C1(COC)C(C@H)2COC(COC)C(C@H)2COC1					9,12		150,59
p-tert.-Butylphenol-monoglycidylether (p-tert-Butylphenylglycidylether)	3101-60-8	C1(C)C(C)C(C)C1C		6,9					
Phenylglycidylether	122-60-1	C1(C)C(C)C(C)C1C		0,46	18,43	87,36	16	42,92	182
o-Kresylglycidylether	2210-79-9	C1(C)C(C)C(C)C1C		1,6	18,66	0	15,39	46,78	151,15
Kresylglycidylether, Isomerengemisch	26447-14-3	C1(C)C(C)C(C)C1C							
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	90-72-2	C1(C)C(C)C(C)C1C							
N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin	2372-82-9	N(CCN)CCN							
3-Aminopropyltriethoxysilan	919-30-2	[Si](CCN)(OCC)OCC							
Bis[(dimethylamino)methyl]phenol	71074-89-0	CN(C)C(C)C(C)C							
Propantriolglycidylether (1,2,3-Propanetriol, glycidyl ethers bzw. 1,2,3-Propanetriol)	90529-77-4 / 2503	C1OC(C@H)1CC(O)CC(O)C1							
N,N-Dimethyl-cyclohexanamin	88-94-2	C1(C)C(C)C(C)C1C							
7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ylmethyl 7-oxabicyclo[4.1.0]heptane-3-carboxylat	2386-87-0	O1C(C@H)2(C)C(C@H)1C(C)C(C)C1							
4,4'-Methylenbis(N,N-bis(2,3-epoxypropyl)anilin)	28768-32-3	O1C(C@H)2(C)C(C@H)1C(C)C(C)C1							
DGEBF - a (O'Boyle 2014)		CC(C)C1(C)C(C)C(C)C1							2,39
DGEBF - a (O'Boyle 2014)		CC(C)C1(C)C(C)C(C)C1							2,21
DGEBF - a (O'Boyle 2014)		CC(C)C1(C)C(C)C(C)C1							2,56

Daten generiert in FP-0324

Daten generiert in FP-0384

