

VALUTAZIONE IN VITRO DELL'ATTIVITA' IDRATANTE SU CHERATINOCITI UMANI

In vitro hydrating activity on human keratinocytes

COMMITTENTE/CUSTOMER	Eurofins Biolab S.r.l. Via Bruno Buozzi, 2 20090 Vimodrone (MI) - Italia
SPONSOR	Farmaceutici Damor S.p.a. 27 Via Scaglione Emilio Napoli (NA) 80145 - Italia
CAMPIONE/SAMPLE	RIGENASE Lotto/Batch: RS1601/B
DATA REPORT/REPORT DATE	23/03/2018
REPORT N./REPORT N.	REL/0650/2018/EFF/ELB

**Sede legale
e laboratorio analisi**

Via Quarantadue Martiri 213/B
28924 Verbania/VB
Italia

Pho. +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

**Studi Clinici
e Cosmetologici**

Via Bruno Buozzi 4
Via Burrone 51 - Edificio C
20090 Vimodrone/MI
Italia

www.abich.it
www.abich.ca

Indice/ Table of contents

1	PARTE PRIMA/PART ONE – INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION	3
1.1	Committente/Customer	3
1.2	Sponsor	3
1.3	Campione Analizzato/Tested Sample	3
1.4	Controlli/ Controls	3
1.5	Test/Assay:	3
1.6	Laboratorio incaricato/Entrusted laboratory	4
1.7	Date dello Studio/Study Dates	4
1.8	Ricercatore principale/Main investigator	4
1.9	Direttore dello Studio/ Study Director	4
1.10	Responsabile Assicurazione Qualità / Quality assurance manager	4
2	PARTE SECONDA/PART TWO	5
	PROTOCOLLO SPERIMENTALE/ STUDY DESIGN	5
2.1	Scopo del test/ Purpose of the test	5
2.2	Esecuzione del test/Assay procedures	5
2.2.1	Modello cellulare/Cell model:	5
2.2.2	Trattamento ed esposizione /Treatment and exposure	5
2.2.3	Test di vitalità cellulare MTT/MTT cell vitality assay	6
2.2.4	Espressione dei risultati/Expression of results:	6
2.3	Interpretazione dei risultati/Results interpretation	7
2.4	Interpretazione dei risultati/Results interpretation:	7
3	PARTE TERZA/PART THREE	8
	RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS	8
3.1	Requisiti di accettabilità del test /Assay validity requirements	8
3.2	Risultati/Results	9
3.2	Conclusioni/Conclusions	10
4	PARTE QUARTA/PART FOUR	11
	Bibliografia/ Bibliography	11

ALLEGATI/ ENCLOSURE:

A) DATI GREZZI/ RAW DATA

Nota/Note:

Il risultato dei test citati nel presente rapporto si riferisce esclusivamente al/ai prodotto/i testato/i e alle particolari condizioni sperimentali impiegate nel test. Il presente rapporto non può essere riprodotto parzialmente senza il consenso preliminare scritto degli sperimentatori.

The results of the test in this report refer only to the tested product/s and to the particular experimental conditions here employed. This report cannot be partially duplicated without the preliminary written approval of the experimenters

Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B
28924 Verbania/VB
Italia

Pho. +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4
Via Burrone 51 - Edificio C
20090 Vimodrone/MI
Italia

www.abich.it
www.abich.ca

1 **PARTE PRIMA/PART ONE – INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION**

1.1 **Committente/Customer**

Eurofins Biolab S.r.l.
Via Bruno Buozzi, 2
20090 Vimodrone (MI) - Italia

1.2 **Sponsor**

Farmaceutici Damor S.p.a.
27 Via Scaglione Emilio
Napoli (NA) 80145 - Italia

1.3 **Campione Analizzato/Tested Sample**

Campione/Sample	Codice interno/ Internal code	Descrizione/Description
RIGENASE Lotto/Batch: RS1601/B	1072/18-01	liquido / liquid

1.4 **Controlli/ Controls**

Controlli/Controls	Fornitore/ Supplier	Lotto/Batch
NaCl 250 mOsm	FARMALABOR	R1501673

1.5 **Test/Assay:**

- Protezione da stress iperosmotico attraverso valutazione della vitalità cellulare con test MTT su cheratinociti umani coltivati in monostrato.
- Iperosmotic stress protection by evaluating the cell viability by MTT test on human keratinocytes monolayers.

Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B
28924 Verbania/VB
Italia

Pho. +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4
Via Burrone 51 - Edificio C
20090 Vimodrone/MI
Italia

www.abich.it
www.abich.ca

1.6 Laboratorio incaricato/Entrusted laboratory

ABICH S.r.l.
Via 42 Martiri, 213/B – 28924
Verbania - Italy - tel +39 (0)323 586239

1.7 Date dello Studio/Study Dates

Inizio/Start: 19/03/2018
Fine/End: 22/03/2018

1.8 Ricercatore principale/Main investigator

Dr Eleonora Fabbri, Biologa molecolare e cellulare/ Cellular and molecular biologist
ABICH S.r.l.

1.9 Direttore dello Studio/ Study Director

Dr. Elena Bocchietto, Biologa specialista in Biotecnologie/ Biologist, biotechnology specialist.
ABICH S.r.l.

1.10 Responsabile Assicurazione Qualità / Quality assurance manager

Dr. Gianmarco Meo, Biologo molecolare e cellulare/ Cellular and molecular biologist
ABICH S.r.l.

Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B
28924 Verbania/VB
Italia

Pho. +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4
Via Burrone 51 - Edificio C
20090 Vimodrone/MI
Italia

www.abich.it
www.abich.ca

2 PARTE SECONDA/PART TWO

PROTOCOLLO SPERIMENTALE/ STUDY DESIGN

2.1 Scopo del test/ Purpose of the test

Lo scopo del lavoro è quello di valutare il potere idratante di una sostanza o di una miscela di sostanze su colture di cheratinociti da cute umana. Le cellule sono esposte in vitro ad uno stress iperosmotico con aggiunte di cloruro di sodio nel medium, che provoca sofferenza e morte cellulare per disidratazione. Si valuta se le cellule trattate con il campione oggetto di studio a diverse concentrazioni presentano una maggior vitalità rispetto alle cellule stressate e non trattate. L'aggiunta nel medium di componenti idratanti noti ad effetto igroscopico, è efficace nel trattenere e cedere alle cellule maggiori quantità acqua e nel proteggerle quindi dalla disidratazione indotta da stress osmotico.

L'effetto idratante del campione viene quindi valutato indirettamente in termini di protezione della vitalità cellulare in presenza di stress, mediante colorazione con MTT. Questo metodo colorimetrico si basa sulla misura indiretta della vitalità cellulare attraverso la capacità di un enzima mitocondriale presente solo nelle cellule vitali, la succinato deidrogenasi, di metabolizzare il substrato (i sali di tetrazolio) sviluppando una reazione colorata.

Aim of the study is to assess the hydrating potential of a substance or of a mixture on human skin-derived keratinocytes.

Cells are exposed to an in vitro hyper-osmotic stress by adding sodium chloride to the cell medium that causes cells suffering and death for dehydration. We evaluate if the cells treated with the sample at different concentrations show a higher viability rate in comparison with the stressed and untreated cells.

Adding to the cell medium known hydrating hygroscopic ingredients, we obtain an increased capability of water retention and release to the cells that protects them from the stress-induced dehydration. The hydrating effect of the sample is hence measured in an indirect way by assessing the cell viability protection under stress, by MTT assay. This colorimetric assay measures the cell viability by checking the activity of an enzyme, the mitochondrial succinate dehydrogenase that is present in the living cells only, to metabolise the tetrazolium salt giving a coloured reaction.

2.2 Esecuzione del test/Assay procedures

2.2.1 Modello cellulare/Cell model:

E' stata utilizzata una linea di cheratinociti umani (cellule HaCaT). Le cellule sono coltivate in DMEM contenente 10% FBS e antibiotici.

The test is carried out on a human keratinocytes (HaCaT cell) cell line. Cells are cultured in DMEM containing 10% FBS and antibiotics.

2.2.2 Trattamento ed esposizione /Treatment and exposure

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e lasciate crescere per 24h a 37°C e 5% CO₂. Il secondo giorno le cellule hanno subito stress osmotico per 24h con NaCl 250 mOsm. Il terzo giorno il terreno è stato sostituito con terreno di coltura fresco contenente il campione alle concentrazioni di 5 e 2,5 mg/ml. Il campione è stato sciolto direttamente nel terreno di coltura. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato. Quindi cellule stressate e non trattate con il campione (CDNT) sono state usate come controllo positivo dell'esperimento, mentre cellule non stressate e non trattate con il campione sono state utilizzate come controllo negativo. Al termine dell'incubazione

Analisi biologiche e chimiche

è stato quindi eseguito il test di citotossicità (MTT) per valutare la percentuale di sopravvivenza cellulare.

Cells have been seeded in 96 wells plates and allowed to grow for 24 h at 37°C and 5% CO₂. The second day cells underwent osmotic stress for 24h with NaCl 250 mOsm. The third day medium has been replaced with a fresh one, supplemented with the tested product at concentration of 5 and 2.5 mg/ml. The sample has been dissolved directly in culture medium. The test has been carried out in three replica for each test dilution.

Stressed cells untreated with the sample (CDNT) and unstressed untreated cells have been used as controls in the experiment. At the end of the incubation period, the cells are tested for their viability with the citotoxicity (MTT) assay.

2.2.3 Test di vitalità cellulare MTT/MTT cell vitality assay

Il terreno di coltura viene aspirato e le cellule incubate in una soluzione 1mg/ml di MTT, per 2h a 37°C. La soluzione viene rimossa e sostituita con isopropanolo con successivi 40' di incubazione a temperatura ambiente e con agitazione a media velocità.

Viene letta l'assorbanza a 570 nm con un colorimetro (Tecan modello Sunrise remote) equipaggiato con un lettore di piastre sottraendo la lettura del fondo a 650 nm. Le assorbanze vengono corrette sottraendo le letture dovute al mezzo diluente.

Culture medium is removed and the cells incubated for 2 h in 1mg/ml MTT solution at 37°C. The solution is then removed and replaced with isopropanol, with further 40' incubation at room temperature under medium speed shaking.

The absorbance at 570 nm is measured with a microplate reader (Tecan modello Sunrise remote), with background clearing at 650 nm. The absorbance values are corrected by subtracting the reading of the blanks, with the diluent only.

2.2.4 Espressione dei risultati/Expression of results:

La vitalità cellulare viene espressa in percentuale secondo la formula:

% vitalità cellulare = [OD (570 nm - 650 nm) prodotto testato/ OD (570 nm - 650 nm) controllo cellule non disidratate] x 100

Quindi viene calcolata la mortalità cellulare:

% mortalità cellulare = 100 - % di vitalità cellulare

Per valutare la protezione della vitalità cellulare si utilizza la seguente formula:

% protezione dalla disidratazione =

(%mortalità cellulare_{CDNT} - %mortalità cellulare_{CDT}) / %mortalità cellulare_{CDNT} *100

Dove

CDNT = cellule disidratate non trattate con il campione

CDT = cellule disidratate trattate con il campione)

The cell viability is expressed in percentage terms:

% cell viability = [OD(570 nm - 650 nm) test product / OD(570 nm - 650 nm) negative control] x 100

So the cell death rate is calculated as:

Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B
28924 Verbania/VB
Italia

Pho. +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4
Via Burrone 51 - Edificio C
20090 Vimodrone/MI
Italia

www.abich.it
www.abich.ca

% cell death = 100 - % cell viability

To evaluate the viability cell protection:

% protection from dehydration=

$(\% \text{ cell death}_{\text{CDNT}} - \% \text{ cell death}_{\text{CDT}}) / \% \text{ cell death}_{\text{CDNT}} * 100$

Where

CDNT = dehydrated cells not treated with the sample

CDT = dehydrated cells treated with sample

2.3 Interpretazione dei risultati/Results interpretation

per il controllo negativo: il valore medio di OD delle repliche deve essere > 0,6
la deviazione standard deve essere ≤ 18%

per il controllo positivo(CP): la deviazione standard deve essere ≤ 18%

per il campione : la deviazione standard deve essere ≤ 18%

for negative control: the mean OD value of the replica has to be > 0.6
medium of two blank column have not to be more differ than 15%

for positive control(CP): the standard deviation has to be ≤ 18%

for the sample : the standard deviation has to be ≤ 18%

2.4 Interpretazione dei risultati/Results interpretation:

La differenza di mortalità cellulare delle cellule trattate con la sola soluzione salina, rispetto a quelle successivamente trattate con il campione viene utilizzata per dare un giudizio sull'efficacia.

A different cell mortality between the cell treated only with the saline solution and cell treated with saline solution and sample, is used to give a judgment of the sample.

Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B
28924 Verbania/VB
Italia

Pho. +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4
Via Burrone 51 - Edificio C
20090 Vimodrone/MI
Italia

www.abich.it
www.abich.ca

3 PARTE TERZA/PART THREE RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS

3.1 *Requisiti di accettabilità del test /Assay validity requirements*

	Valore/Value	Limiti/ Limits	Risultato/Result
Controllo negativo/ Negative control: OD media 3 repliche/ mean OD from 3 replica	2,37	>0,6	Conforme/ Complies
Controllo negativo/ Negative control: Dev. Standard % / % stand. Dev.	11,49	≤ 18%	Conforme/ Complies
CP: Dev. Standard % / % stand. Dev.	5,05	≤ 18%	Conforme/ Complies
Campione/sample: Dev. Standard % a tutte le concentrazioni/ % stand. Dev. at all concentrations	< 18	≤ 18%	Conforme/ Complies

I criteri di accettabilità del test (vedi § 2.3) sono conformi, quindi il test è considerato valido.

Acceptance criteria of the assay (see § 2.3) comply, hence the assay is valid.

Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B
28924 Verbania/VB
Italia

Pho. +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

Studi Clinici e Cosmetologici

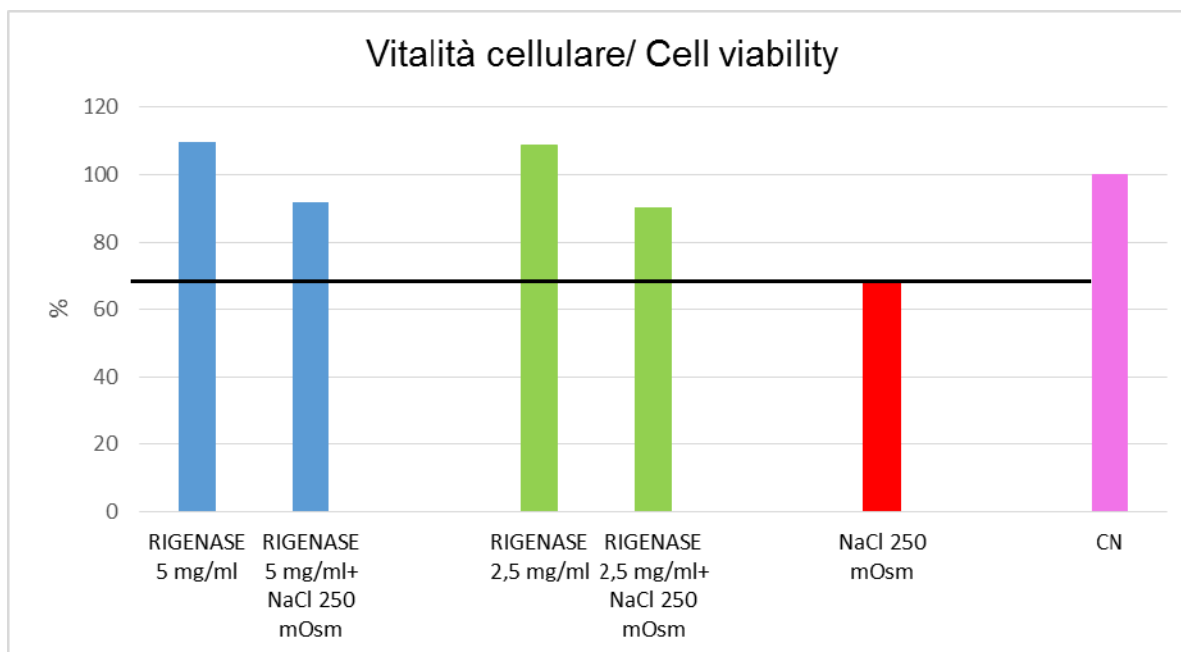
Via Bruno Buozzi 4
Via Burrone 51 - Edificio C
20090 Vimodrone/MI
Italia

www.abich.it
www.abich.ca

3.2 Risultati/Results

	% vitalità cellulare (DS)/ % viability cell (DS)	Mortalità cellulare%/ Cell death %	% protezione dalla disidratazione/ % protection from dehydration
RIGENASE Lotto/Batch: RS1601/B 5 mg/ml	109.38 (1.29)	0	N/A
RIGENASE Lotto/Batch: RS1601/B 5 mg/ml + NaCl 250mOsm	91.74 (4.79)	8.26	74.33
RIGENASE Lotto/Batch: RS1601/B 2,5 mg/ml	108.44 (3.00)	0	N/A
RIGENASE Lotto/Batch: RS1601/B 2,5 mg/ml + NaCl 250mOsm	90.23 (4.22)	9.77	69.62
NaCl 250 mOsm CDNT*	67.83 (5.05)	32.17	N/A

* CDNT = cellule disidratate non trattate con il campione/ cell dehydrated not treated with the sample



Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B
28924 Verbania/VB
Italia

Pho. +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4
Via Burrone 51 - Edificio C
20090 Vimodrone/MI
Italia

www.abich.it
www.abich.ca

3.2 Conclusioni/Conclusions

Nel test sopra riportato il campione / In the above experimental conditions, the sample:

RIGENASE

Lotto/Batch: RS1601/B

Ha mostrato di possedere un'attività dose-risposta di protezione dalla disidratazione su cheratinociti umani in vitro. L'effetto massimo si riscontra alla concentrazione di 5 mg/ml (74.33% di protezione).

Did show an in vitro dose-related protection against dehydration on human keratinocytes.

The highest effect is pointed out at 5 mg/ml concentration (74.33% of protection).

Data/Date: 23/03/2018

Il Direttore dello studio/ Study Director
Dr. Elena Bocchietto

Documento con firma digitale

Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B
28924 Verbania/VB
Italia

Pho. +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4
Via Burrone 51 - Edificio C
20090 Vimodrone/MI
Italia

www.abich.it
www.abich.ca

4 PARTE QUARTA/PART FOUR

Bibliografia/ Bibliography

1. Pirot N. Effect of osmosis on water–holding capacity of stratum corneum and skin hydration
Exogenous Dermatology, 2: 252-257 (2003)
2. Mossman, T. (1993). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**:55-63.

Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B
28924 Verbania/VB
Italia

Pho. +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4
Via Burrone 51 - Edificio C
20090 Vimodrone/MI
Italia

www.abich.it
www.abich.ca

Analisi biologiche e chimiche

Allegato A alla relazione n./ Enclosure A to the report n. 0650-18

DATI GREZZI/ RAW DATA

SUNRISE; Serial number: 03930004669; Firmware: V 3.17 13/06/02; XFLUOR4 Version: V 4.50												
Date:	22/3/18											
Time:	14:56											
Measurement mode:	Absorbance											
Measurement wavelength:	570 nm											
Reference wavelength:	650 nm											
Read mode:	Normal											
Shake duration (Inside Normal):	100 s											
Dual wave data (difference)												
<	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1510	0,1270	0,1050	0,1340	0,1670	0,1960	0,1000	0,0960	0,1400	0,1830	0,1890	0,1950
B	0,0880	2,6540	1,4960	2,4910	2,6010	2,6330	2,2500	2,1640	2,0310	2,2880	2,1640	0,1450
C	0,0610	2,5180	1,7350	2,5470	2,6250	2,5950	2,0470	2,0390	2,1690	2,2030	2,1370	0,1110
D	0,0780	2,6790	1,6000	2,6110	2,5640	2,4950	2,2370	2,2140	2,2260	2,2730	2,0920	0,0660
E	0,1050	2,6430	2,2210	1,9070	2,9700	2,8920	0,3270	0,4700	0,3830	0,3900	0,3780	0,0810
F	0,1260	2,4960	2,8440	2,0000	2,7510	2,3510	0,3540	0,3580	0,3600	0,3460	0,3430	0,1080
G	0,1690	2,5080	2,6650	2,1000	2,5830	2,8420	0,3240	0,3300	0,3340	0,3360	0,3400	0,1340
H	0,1380	0,0880	0,1100	0,1470	0,1650	0,1840	0,1600	0,1440	0,1040	0,0740	0,1010	0,1210

Sede legale e laboratorio analisi

Via Quarantadue Martiri 213/B
28924 Verbania/VB
Italia

Pho. +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4
Via Burrone 51 - Edificio C
20090 Vimodrone/MI
Italia

www.abich.it
www.abich.ca