



Analisi biologiche e chimiche



Azienda Certificata  
UNI EN ISO 9001:2008  
Certificato N. 501004992  
Centro di saggio BPL

REL/0382/2017/ALLTOX/ELB  
B83 Rev 00/16

## TEST DI DEGRANULAZIONE SU BASOFILI

### *Degranulation test on basophil cells*

COMMITTENTE/CUSTOMER	Sinerga S.p.A. Via della Pacciarna, 67 21050 Gorla Maggiore (VA) - Italia
SPONSOR	Sinerga S.p.A. Via della Pacciarna, 67 21050 Gorla Maggiore (VA) Italia
CAMPIONE/SAMPLE	Soluzione 1% LENIPHENOL Lotto/Batch: n.p.
DATA REPORT/REPORT DATE	28/02/2017
REPORT N./REPORT N.	REL/0382Rev.01/2017/ALTOX/ELB

**Sede legale  
e laboratorio analisi**

Via Quarantadue Martiri 213/B  
28924 Verbania/VB  
Italy  
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  
20090 Vimodrone/MI  
Italy

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)



Analisi biologiche e chimiche



Azienda Certificata  
UNI EN ISO 9001:2008  
Certificato N. 501004992  
Centro di saggio BPL

REL/0382/2017/ALLTOX/ELB  
B83 Rev 00/16

## 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 Material .....	3
1.4 Controlli/ Controls .....	3
1.5 Test/Assay: .....	4
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 Valutazione della degranulazione/ Evaluation of degranulation .....	6
2.2.4 Espressione dei risultati/ Expression of results .....	6
2.3 Criteri di accettabilità del metodo/ Acceptance criteria of method .....	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 .....	11
4 PARTE QUARTA/PART FOUR .....	12
Bibliografia/Bibliography .....	12

### 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 Pho. +39 0323 586239/496041 CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035  
28924 Verbania/VB Fax +39 0323 496877 R.E.A.: 189901  
Italia info@abich.it Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

### Studi Clinici e Cosmetologici

Via Bruno Buozzi 4  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)



Analisi biologiche e chimiche



**Azienda Certificata**  
UNI EN ISO 9001:2008  
Certificato N. 501004992  
Centro di saggio BPL

REL/0382/2017/ALLTOX/ELB  
B83 Rev 00/16

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

### 1.1 Committente/Customer

Sinerga S.p.A.  
Via della Pacciarna, 67  
21050 Gorla Maggiore (VA) - Italia

### 1.2 Sponsor

Sinerga S.p.A.  
Via della Pacciarna, 67  
21050 Gorla Maggiore (VA)  
Italia

### 1.3 Campione Analizzato/Tested Material

Campione/Sample	Codice interno/ Internal code	Descrizione/Description
Soluzione 1% LENIPHENOL Lotto/Batch: n.p.	1140/17-01	fluido marrone / brown fluid

np=non pervenuto/not identified

### 1.4 Controlli/ Controls

Controlli/Controls	Fornitore/ Supplier	Lotto/Batch
Acido ialuronico sale sodico / hyaluronic acid monosodic Controllo inibizione della degranulazione/ Inhibition of degranulation control	SIGMA 53747	2574545
Terreno di coltura/ Culture medium Controllo negativo/ Negative control (CN)	GIBCO 21870-076	1644906
Anticorpo anti IgE/ Anti IgE antibody Positive control of maximal degranulation (PC)	BÜHLMANN (codice B-CASTSTCON)	lotto 4271.x

**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  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)



Analisi biologiche e chimiche



Azienda Certificata  
UNI EN ISO 9001:2008  
Certificato N. 501004992  
Centro di saggio BPL

REL/0382/2017/ALLTOX/ELB  
B83 Rev 00/16

### 1.5 Test/Assay:

- Valutazione preliminare della vitalità cellulare/citotossicità basofili di ratto tramite metodica MTT
- Valutazione della capacità del campione testato di inibire la degranulazione dei basofili di ratto
- Preliminary evaluation of cytotoxicity on rodent basophil cells through MTT assay
- Evaluation of the ability of the tested sample to inhibit degranulation

### 1.6 Laboratorio incaricato/Entrusted laboratory

Istituto Scientifico Ospedale San Raffaele, via Olgettina 60 Milano, Laboratorio di immunologia molecolare e cellulare San Raffaele/ Scientific Institute, via Olgettina 60, Milano Italy, Cell and molecular Immunology Laboratory

### 1.7 Date dello Studio/Study Dates

Inizio/Start: 15/02/2017

Fine/End: 27/02/2017

### 1.8 Ricercatore principale/Main investigator

Dr. Samuele Burastero, Medico chirurgo, Specialista in Allergologia e Immunologia Clinica/MD, Allergology and Clinical Immunology Specialist,  
Istituto Scientifico Ospedale San Raffaele/ Scientific Institute San Raffaele Hospital

### 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. Valentina Celada, ingegnere biomedico/ Biomedical engineer.

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  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)

## 2 PARTE SECONDA/PART TWO

### PROTOCOLLO SPERIMENTALE/ STUDY DESIGN

#### 2.1 Scopo del test/ Purpose of the test

Scopo del test è valutare l'efficacia del campione testato nell'inibire la degranulazione dei basofili indotta da IgE. I basofili sono le cellule effettive terminali della risposta allergica in vitro. L'interazione tra basofili ed IgE secrete è mediata dal recettore ad alta affinità per le IgE (Fc<sub>ε</sub>RI). L'attivazione del recettore causata da antigeni o apteni induce la degranulazione dei basofili, scatenando *in vivo* la reazione di ipersensibilità immediata. Questa reazione allergica è caratterizzata dal rapido rilascio (approssimativamente entro le prime due ore) di specifici mediatori infiammatori preformati (istamina, leucotrieni, trombossano, enzimi dei granuli basofilici, esosaminidasi), e determina arrossamento, prurito e reazioni infiammatorie locali. La cellula attivata inoltre sintetizza ex-novo ulteriori citochine, estendendo la risposta infiammatoria.

La capacità della sostanza o prodotto topico testato di inibire la degranulazione dei basofili può essere interpretata come un indicatore della sua capacità di inibire i sintomi sopra descritti, in particolar modo il prurito.

The objective of the test is to evaluate the sample's efficacy in inhibiting the degranulation of basophil cells mediated by IgE. Basophils are the terminal effectors of *in vivo* cells reactions. The interaction between basophils and IgEs is mediated by the high-affinity IgE receptor (Fc<sub>ε</sub>RI). The activation of the receptor caused by antigens or aptens induces basophil degranulation, triggering an immediate hypersensitivity reaction *in vivo*. This allergic reaction is defined by the quick release of pre-stored inflammatory mediators (histamine, leukotrienes, thromboxane, basophilic enzymes, hexosaminidases), causing redness, rashes, itchiness and local inflammatory reactions. The activated basophilic cell also synthesizes new cytokines extending the inflammatory reaction.

The ability of a tested substance or topical products to inhibit the degranulation of basophil cells may be read as an indicator of its capability to inhibit the above described symptoms and above them mainly itching.

#### 2.2 Esecuzione del test/Assay procedures:

##### 2.2.1 Modello cellulare/Cell model:

E' stata utilizzata una linea di basofili di ratto trasfettati (RBL-2H3 ATCC® CRL-2256™) esprimenti in modo stabile il recettore delle IgE umane (Fc<sub>ε</sub>RI). Le cellule sono coltivate in RPMI contenente 10% FCS e 2 mM di glutamina.

The test is carried out on a cell line of transfected rat basophil cells (RBL-2H3 ATCC® CRL-2256™) expressing the IgE human receptor (Fc<sub>ε</sub>RI). Cells are kept in RPMI containing 10% FCS and 2 mM glutamine.

##### 2.2.2 Trattamento ed Esposizione/Treatment and Exposure

Il campione è stato sciolto in medium di coltura delle cellule a diverse diluizioni e sottoposto a test preliminare di citotossicità per valutare a quale concentrazione la sostanza potesse essere impiegata in vitro senza causare mortalità cellulare, evento che provoca alterazione dei risultati.

Il controllo negativo, equivalente alla degranulazione spontanea, consiste in cellule non trattate.

Sodio ialuronato in concentrazioni scalari è stato impiegato come controllo dell'inibizione della degranulazione.

#### 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](mailto: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  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)



Analisi biologiche e chimiche



Azienda Certificata  
UNI EN ISO 9001:2008  
Certificato N. 501004992  
Centro di saggio BPL

REL/0382/2017/ALLTOX/ELB  
B83 Rev 00/16

Il controllo positivo, equivalente alla degranulazione massima, consiste in cellule esposte ad Anticorpi Anti-recettore umano delle IgE

Lisati cellulari in Triton 1% sono stati inoltre impiegati come ulteriore controllo per valutare il rilascio massimo della molecola analizzata.

The product was solubilized in cell culture medium at different concentrations. The product underwent a preliminary cytotoxicity screening on the cells to decide the best concentration to test it without cytotoxic effects on the cells, in order to avoid false results.

Untreated cells were used as negative control for the spontaneous degranulation.

Sodium hyaluronan in serial dilutions was used as a control of the inhibition of basophil degranulation.

A positive control consisting in cells exposed to Anti-human IgE receptor antibodies was used to evaluate the maximal degranulation level.

Cell lysates in 1% Triton were also analysed in order to evaluate the highest possible release of the analysed molecule.

### 2.2.3 Valutazione della degranulazione/ Evaluation of degranulation

Al fine di valutare l'interferenza sulla degranulazione da parte del prodotto testato, il campione è stato preincubato con una linea di basofili di ratto trasfettati (RBL) esprimenti in modo stabile il recettore delle IgE umane (Fc $\xi$ RI).

Il rilascio della  $\beta$ -esoesaminidasi durante la degranulazione è stato misurato colorimetricamente nel soprannatante delle cellule addizionando di p-nitrofenil-N-acetyl- $\beta$ -glucosamina in buffer citrato 0,1 M (pH = 6,2) e incubando a 37°C per 120 minuti.

La reazione è stata terminata utilizzando 0,1 M di tampone carbonato (PH=10), e l'assorbanza è stata letta a 405 nm. Il soprannatante di cellule non trattate è stato impiegato come controllo negativo. La stimolazione massima delle cellule RBL-SX38 è stata valutata nel lisato ottenuto con Triton X-100.

In order to evaluate the effect of the tested product on basophil degranulation, the sample was pre-incubated with a cell line of transfected rat basophil cells (RBL) expressing the IgE human receptor (FcRI).

The release of  $\beta$ -hexosaminidase during degranulation was monitored on RBL-SX38 cell supernatant added with p-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine (Sigma-Aldrich) in 0.1 M citrate buffer (pH 6.2) and incubated at 37°C for 120 min. The reaction was terminated using 0.1M carbonate buffer (pH 10), and the absorbance was read at a 405 nm wavelenght. The supernatant of untreated cells was used as negative control. The maximal stimulation of RBL-SX38 was evaluated on a Triton X-100 lysate of the cell monolayer.

The release of  $\beta$ -hexosaminidase during degranulation was monitored on RBL-SX38 cell supernatant added with p-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine (Sigma-Aldrich) in 0.1 M citrate buffer (pH 6.2) and incubated at 37°C for 120 min. The reaction was terminated using 0.1M carbonate buffer (pH 10), and the absorbance was read at a 405 nm wavelenght. The supernatant of untreated cells was used as negative control. The maximal stimulation of RBL-SX38 was evaluated on a Triton X-100 lysate of the cell monolayer.

### 2.2.4 Espressione dei risultati/ Expression of results

La percentuale di inibizione della degranulazione di basofili attivati con recettore per IgE è stata calcolata secondo la seguente formula:

% inibizione della degranulazione = 100-[ (OD campione + PC - OD CN) / (OD CP - OD CN)] \*100

**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  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)



Analisi biologiche e chimiche



Azienda Certificata  
UNI EN ISO 9001:2008  
Certificato N. 501004992  
Centro di saggio BPL

REL/0382/2017/ALLTOX/ELB  
B83 Rev 00/16

PC: controllo positivo (Anti-human IgE receptor)

CN: controllo negativo (degranulazione spontanea)

The inhibition degranulation percentage of activated basophil with IgE receptor has been calculated as:

$$\% \text{ degranulation inhibition} = 100 - [(OD \text{ sample} + PC - OD \text{ CN}) / (OD \text{ CP} - OD \text{ CN})] * 100$$

PC: positive control (Anti-human IgE receptor)

CN: negative control (spontaneous degranulation)

### **2.3 Criteri di accettabilità del metodo/ Acceptance criteria of method**

Per la degranulazione spontanea OD < 0,1

For the spontaneous degranulation OD < 0.1

#### **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  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)

### **3 PARTE TERZA/PART THREE**

### **RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS**

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

	<b>Valore/Value</b>	<b>Limiti/ Limits</b>	<b>Risultato/Result</b>
degranulazione spontanea / spontaneous degranulation OD media / mean OD	0,075	< 0,1	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.



Analisi biologiche e chimiche



**Azienda Certificata**  
UNI EN ISO 9001:2008  
Certificato N. 501004992  
Centro di saggio BPL

REL/0382/2017/ALLTOX/ELB  
B83 Rev 00/16

### 3.2 Risultati/Results

Nelle tabelle seguenti vengono riportati i risultati ottenuti mediante analisi del rilascio nel sopranatante cellulare della  $\beta$ -esoesamidinasi come indice di degranulazione dei basofili. I numeri indicano densità ottica (405 nm). In the following tables and graphs, the results are reported expressed as release in the supernatant of  $\beta$ -hexosaminidase, an index of basophil degranulation.

Campioni/Samples	O.D. 405 nm			
Medium (controllo negativo - CN)	0,075			
Anticorpo contro recettore IgE umano/ Anti-human IgE receptor (controllo positivo di degranulazione/positive control of degranulation - CP)	0,966			
Triton X 1% (degranulazione massima/ maximum degranulation)	1,785			
Controllo positivo/ positive control (CP) + Hyaluronic acid (HA)	10 mg/ml	5 mg/ml	2,5 mg/ml	1,25 mg/ml
	0,254	0,465	0,565	0,765
Controllo positivo/ positive control (CP) + Soluzione 1% LENIPHENOL Lotto/Batch: n.p.	5 µl/ml	2,5 µl/ml	1,25 µl/ml	0,06 µl/ml
	0,899	0,936	0,947	0,965
Hyaluronic acid (HA)	10 mg/ml	5 mg/ml	2,5 mg/ml	1,25 mg/ml
	0,069	0,072	0,080	0,070
Soluzione 1% LENIPHENOL Lotto/Batch: n.p.	5 µl/ml	2,5 µl/ml	1,25 µl/ml	0,06 µl/ml
	0,074	0,075	0,069	0,076

**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  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)



Analisi biologiche e chimiche



**Azienda Certificata**  
UNI EN ISO 9001:2008  
Certificato N. 501004992  
Centro di saggio BPL

REL/0382/2017/ALLTOX/ELB  
B83 Rev 00/16

Campioni/Samples	%Inibizione della degranulazione/ %Degranulation inhibition			
	5µl/ml	2,5µl/ml	1,25µl/ml	0,06µl/ml
Soluzione 1% LENIPHENOL Lotto/Batch: n.p.	7,5 %	3,4 %	2,2 %	0,1 %
Hyaluronic acid (HA) Inibitore della de granulazione in vitro/ in vitro degranulation inhibitor	10 mg/ml	5 mg/ml	2,5 mg/ml	1,25 mg/ml
	79,9 %	56,3 %	45,0 %	22,6 %

Il campione è risultato leggermente efficace nell'inibire con un effetto dose dipendente la degranulazione dei basofili. L'attività maggiore si riscontra alle concentrazioni più alte testate. L'interferenza sulla degranulazione spontanea appare non apprezzabile. / The tested sample is slightly effective in inhibiting basophil degranulation in a dose dependent way. The highest effect is pointed out at the highest tested concentrations. The interference on spontaneous degranulation is not detectable.

**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  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)



Analisi biologiche e chimiche



Azienda Certificata  
UNI EN ISO 9001:2008  
Certificato N. 501004992  
Centro di saggio BPL

REL/0382/2017/ALLTOX/ELB  
B83 Rev 00/16

### 3.2 Conclusioni/Conclusions

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

## Soluzione 1% LENIPHENOL

Lotto/Batch: n.p.

*MOSTRA UN LEGGERO EFFETTO DI INIBIZIONE DOSE DIPENDENTE SULLA DEGRANULAZIONE DEI BASOFILI.*

*SHOWS A SLIGHT DOSE DIPENDENT INHIBITING EFFECT ON BASOPHIL DEGRANULATION*

Data/Date: 28/02/2017

Il Direttore dello studio/ Study Director  
Dr. Elena Bocchietto



#### 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  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)

## **4 PARTE QUARTA/PART FOUR**

### **Bibliografia/Bibliography**

- 1) De Silva O et al. Alternative methods for skin sensitisation testing. ATLA, 1996; 24:683-705.
- 2) Fubini B et al. Non-animal tests for evaluating the toxicity of solid xenobiotics. ATLA, 1998; 26: 579-617.
- 3) Balls M et al. The three Rs: the way forward. ATLA, 1995; 23:838-866.
- 4) Michael Balls, Enrico Sabbioni. Promotion of research on *in vitro* immunotoxicology. *The Science of Total Environment*, 270 (2001) 21-25.
- 5) Alternative (Non animal) Methods for chemical testing: current status and future prospects. Edited by Andreaw Worth and Michael Balls, ATLA 30, Supplement 1, Chapter 6, pgg 49-53, 2002 European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Institute for Health and Consumer Protection, European Commision Joint Research Centre, Ispra (VA), Italy
- 6) Vangelista, L., E. Soprana, M. Cesco-Gaspere, P. Mandiola, G. Di Lullo, R.N. Fucci, F. Codazzi, A. Palini, G. Paganelli, O.R. Burrone, and A.G. Siccardi. 2005. Membrane IgE binds and activates Fc epsilon RI in an antigen-independent manner. J Immunol 174:5602-5611.
- 7) Wiegand, T.W., P.B. Williams, S.C. Dreskin, M.H. Jouvin, J.P. Kinet, and D. Tasset. 1996. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. J Immunol 157:221-230.
- 8) Vangelista, L., M. Cesco-Gaspere, R. Lorenzi, and O. Burrone. 2002. A minimal receptor-Ig chimera of human Fc epsilon RI alpha-chain efficiently binds secretory and membrane IgE. Protein Eng 15:51-57.

**Sede legale  
e laboratorio analisi**

Via Quarantadue Martiri 213/B Pho. +39 0323 586239/496041 CF/VAT/Reg. Imp. VCO: 01864020035  
28924 Verbania/VB Fax +39 0323 496877 R.E.A.: 189901  
Italia info@abich.it Cap. Soc. € 116.000,00 i.v.

**Studi Clinici  
e Cosmetologici**

Via Bruno Buozzi 4  
20090 Vimodrone/MI  
Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)  
[www.abich.ca](http://www.abich.ca)