

U-AIM: Utrecht mikt op proefdier vrije innovatie

Damiën van Berlo

Damiën van Berlo, Universiteit Utrecht; d.vanberlo@uu.nl

Een proefdier vrije wereld

Dat willen we volgens mij allemaal. Maar dan moeten er wèl goede alternatieven zijn voor de klassieke tests op proefdieren. En zo ver zijn we op dit moment nog niet voor de meeste verplichte veiligheidstests voor nieuwe chemische stoffen en medicijnen.

Zoals bij de lezer van Biotechniek ongetwijfeld bekend is, heeft de overheid de doelstelling uitgesproken om vóór 2025 het uitvoeren van dierproeven voor veiligheidsonderzoek van chemische stoffen en geneesmiddelen uit te faseren, op advies van het Nationaal Comité advies dierproevenbeleid [1]. In dierexperimenteel Nederland heeft deze ambitie het nodige stof op doen waaien, er is met name veel discussie (en scepsis) over de haalbaarheid van de aangegeven termijn. In meer recente berichtgeving heeft de overheid dit niet meer zo nadrukkelijk benoemd (bijvoorbeeld in de kamerbrief van Carola Schouten, minister van Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, van 1 juni 2018 [2]): de soep lijkt iets minder heet te worden gegeten, dan deze in eerste instantie werd opgediend. In dit stuk ga ik met name in op een ambitie die de overheid óók nadrukkelijk heeft gecommuniceerd.

Nederland toonaangevend in proefdier vrije innovaties in 2025

Een klein landje, leidend in proefdier vrije innovaties? Dat klinkt ambitieus... En dat is het ook. Als je klein bent maar wel toonaangevend wil worden, zul je slim en doelgericht moeten zijn. Gelukkig heeft Nederland een heel behoorlijke reputatie in wetenschappelijke vakgebieden als Toxicologie en Farmacologie. Deze vakgebieden zijn relevant omdat de meeste wettelijk verplichte dierproeven worden uitgevoerd om de toxicologische of farmacologische eigenschappen van chemische stoffen/medicijnen te onderzoeken.

Er wordt in Nederland zeker veelbelovend onderzoek uitgevoerd naar proefdier vrije innovaties, er liggen verschillende methoden "op de plank" (lees: zijn ontwikkeld/gepubliceerd) met het potentieel om dierproeven te vervangen of verminderen. Echter, doorgaans gebeurt daar om verschillende redenen niets mee nadat de methode is gepubliceerd en het project

»

beëindigd is (de doelstelling van de betreffende projecten is dan bereikt). Er wordt niet doorgepakt, door een model of een cellijn verder te ontwikkelen. Door het model te valideren (is het relevant, betrouwbaar, voorspellend?), en te onderzoeken hoe dit zich verhoudt tot de modellen die de norm zijn. De academische praktijk lijkt slecht verenigbaar met de behoefte vanuit de industrie en de regelgevende instanties.

Dat is eigenlijk helemaal niet zo vreemd. Dit doorpakken is namelijk erg duur en vereist faciliteiten en een organisatiestructuur die zijn ingericht op kwaliteitsstandaarden (bijvoorbeeld Good Laboratory Practice, het welbekende en beruchte GLP) die bij de meeste kennisorganisaties (nog) niet of onvoldoende aanwezig zijn. Daarnaast ontbreekt de coördinatie, de afstemming tussen de verschillende partijen die betrokken zijn bij de ontwikkeling, validatie, toepassing en acceptatie (dit laatste m.n. door regelgevende instanties) van innovatieve proefdiervrije testmethoden. Deze verschillende partijen of stakeholders weten elkaar niet goed te vinden.

De hub: omdat een wiel zonder naaf niet lekker rolt

Dat moeten we dus heel anders gaan doen. In de woorden van Martijn van Dam, toenmalig staatssecretaris van Economische Zaken, is de overgang naar proefdiervrije methoden: "Een transitieproces dat van iedereen veel vraagt en alleen gerealiseerd kan worden als iedereen, op gecoördineerde wijze, dezelfde kant op gaat" [2].

Om dit stuk coördinatie te verzorgen, is er behoefte aan een verbindende structuur die zich tussen de verschillende partijen in bevindt, een "hub". Dit is Engels voor "naaf", het middelpunt van een wiel dat alle spaken verbindt. Binnen de Universiteit Utrecht is om deze reden de hub Utrecht Advanced In vitro Models (U-AIM: spreek uit als "you aim") opgestart [3] U-AIM verbindt de betrokken partijen:

1. De kennisinstellingen: Universiteit Utrecht, Hogeschool Utrecht, Universitair Medisch Centrum Utrecht, TNO, Hubrecht Instituut, RIVM;
2. De (m.n. chemische en farmaceutische) industrie;
3. Regelgevende instanties (bijvoorbeeld het College voor Beoordeling van Geneesmiddelen);
4. Overig, zoals patiëntorganisaties en gezondheidsfondsen. Ook Stichting Proefdiervrij is betrokken; sinds 2012 concentreert deze stichting zich op de ontwikkeling van alternatieven voor dierproeven en het mobiliseren van wetenschappers.

De Heilige Graal is een kristallen bol

Ik begon met de opmerking dat goede alternatieven voor wettelijk verplichte dierproeven op dit moment veelal nog ontbreken of in ieder geval niet ver genoeg ontwikkeld zijn. Maar wat is nu een goede alternatieve testmethode voor chemische stoffen/medicijnen? Waar moet die aan voldoen? Er is een aantal kwaliteitscriteria die in zijn algemeenheid gelden voor testmethoden, zoals nauwkeurigheid, robuustheid, reproduceerbaarheid, specificiteit en sensitiviteit. Het voert te ver om hier nu heel gedetailleerd op in te gaan, het belangrijkste is dat een goede methode in staat moet zijn om te voorspellen wat voor effecten te verwachten zijn in de mens: de predictiviteit. Een goede testmethode is dus als een kristallen bol. Voor chemische stoffen gaat het dan om het voorspellen van de toxiciteit, voor medicijnen gaat het behalve om toxiciteit ook om de werkzaamheid.

Deze voorspellende waarde of predictiviteit van een in vitro test voor de te verwachten effecten in de mens is naar mijn mening de Heilige Graal voor het vervangen van wettelijk verplichte dierproeven. Wanneer een in vitro test minstens even voorspellend is als een in vivo test, dan ligt het voor de hand om die laatste te vervangen. Vanuit het dierethisch perspectief, daarnaast is een in vitro test ook nog eens goedkoper en sneller. >>



*Organ-on-a-chip in actie.
(Universiteit Utrecht).
Foto door Ivar Peel.*

De ontwikkeling van medicijnen wordt goedkoper en sneller, dat betekent dat er meer goede medicijnen op de markt kunnen komen en ze minder hoeven te kosten. Als we dat kunnen bereiken, zijn zowel de patiënten als de proefdieren beter af: alleen maar winnaars.

Als het te mooi klinkt om waar te zijn...

Dan is het dat vaak ook. Maar ik denk dat voor dit specifieke geval, het wens-scenario dichterbij is dan de meesten wellicht denken. Want laten we niet vergeten dat de voorspellende waarde van dierproeven voor de mens niet je-van-het is. Vandaar ook, dat er door regelgevende instanties stevige veiligheidsfactoren worden gebruikt bij het vertalen van een dosis die toxisch is voor een dier (vaak muis of rat) naar de mens. Voor de zekerheid delen we die dosis in het dier dan nog eens door bijvoorbeeld een factor 10 of 100. Voor het testen van de toxiciteit (safety) en werkzaamheid (efficacy) van medicijnen is de situatie niet beter en waarschijnlijk slechter. De Amerikaanse Minister van 'Health and Human Services' zei in 2007: 'Currently, nine out of ten experimental drugs fail in clinical studies because we cannot accurately predict how they will behave in people based on laboratory and animal studies' [6]. In 9 van de 10 gevallen slagen klinische studies (waarbij een medicijn wordt getest in patiënten) dus niet, omdat het gedrag van een medicijn in de mens niet kon worden voorspeld op basis van dierstudies. De ontwikkeling van een medicijn, die tot op dat moment al veel geld heeft gekost (in zijn totaliteit honderden miljoenen tot meer dan een miljard euro), wordt gestopt en al het verrichtte werk kan de klike in... De beschikbare wetenschappelijke literatuur ondersteunt deze jammerlijke constatering.

En dan de voorspelbare onderbouwing

Al heeft die literatuur, zoals gezegd, wel wat weinig 'body'; vermoedelijk is er weinig behoefte om iets dat de standaard is en waarbij we ons veilig voelen, te onderbouwen. Wat we wel terugvinden, is dat voor het testen van bijvoorbeeld het kankerverwekkend potentieel van chemische stoffen, de voorspellende waarde van dierproeven voor de mens laag is [4,5]. En Shanks et al. (2009) vonden geen enkele associatie tussen de fractie (% van de totaal toegediende hoeveelheid) van een medicijn die het bloed weet te bereiken, wanneer we toediening in mensen vergelijken met toediening in apen, knaagdieren of honden [7]. Als men bedenkt dat voor de meeste medicijnen het zieke doelwitorgaan wordt bereikt via de bloedbaan, is dit duidelijk problematisch. In een recent Nederlands onderzoek waarbij er uitgebreid in de registratiedossiers van medicijnen (die confidencieel zijn en dus niet toegankelijk voor het publiek; de betreffende onderzoeksgroep kreeg speciale toestemming) werd geneusd, vond

men dat er wat betreft serieuze bijwerkingen van medicijnen voor slechts minder dan 20% van de medicijnen een voorspellend signaal werd gevonden in dierstudies [8].

Dit betreft echter het risico op bijwerkingen, ofwel de safety. Een belangrijke reden voor het falen van klinische studies is dat een medicijn niet effectief blijkt te zijn in patiënten: de efficacy is laag. In een recent literatuuronderzoek waarin klinische studies met 640 nieuwe medicijnen werden bekeken, vonden de onderzoekers dat lage werkzaamheid in 57% van de onsuccesvolle klinische studies de belangrijkste reden was. Toxiciteit (problematische safety) van het medicijn was in 17% van de gevallen de hoofdreden [9]. In een wat ouder artikel (eind vorig millennium) wordt beschreven dat er in de jaren '90 ongeveer veertien nieuwe medicijnen zijn ontwikkeld die beschermend zouden zijn tegen het optreden van een beroerte (verstoring van de doorbloeding van de hersenen). Deze medicijnen waren alle effectief in diermodellen; geen van allen bleek echter in de mens te werken [10]. Hier zijn meerdere mogelijke redenen voor te noemen, zoals een verschillend behandelingschema voor de patiënten en de dieren. Er lijkt dus fors ruimte te zijn voor verbetering.

Wat je niet goed begrijpt, kun je moeilijk in vitro testen

Voor de duidelijkheid: het is belangrijk dat de veiligheid van nieuwe chemicaliën en medicijnen wordt getest, en als de beste test een dierproef is, dan is daar natuurlijk heel wat voor te zeggen. Het punt dat ik hier probeer te maken, is dat je geen perfecte of zelfs erg goed voorspellende in vitro test hoeft te ontwikkelen om van waarde te zijn. Je moet het alleen aantoonbaar beter doen dan het op dit moment gedaan wordt. En ik denk dat dat wens-scenario wel realistisch is. Al is dit wel een hele klus, zeker voor de meer complexe studies. In dit kader moet immers worden opgemerkt dat geen enkele in vitro test bijvoorbeeld een complete sub-chronische (90-dagen) dierstudie kan vervangen, omdat in die laatste test heel veel verschillende dingen worden gemeten. Je hebt dus een batterij van in vitro tests nodig. Een belangrijke vraag die hierbij moet worden gesteld, is welke eindpunten/markers cruciaal zijn. Om dit in kaart te brengen, worden zogenaamde Adverse Outcome Pathways opgesteld door, of in samenwerking met, teams van experts, waarbij mechanismen in kaart worden gebracht voor de manier waarop toxiciteit van een stof tot uiting kan komen (het veroorzaken van ontsteking is hiervan een voorbeeld). Als we weten welke stappen in dit proces cruciaal zijn (dit noemen we de key events; voor ontsteking kan men dan bijvoorbeeld denken aan het activeren van bepaalde celtypen), biedt dit aanknopingspunten voor welke in vitro tests we moeten gebruiken. Of, wanneer deze nog niet beschikbaar zijn, ontwikkelen.

Van groot belang voor de ontwikkeling van proefdiervrije innovatieve testmethoden en ziektemodellen is dus in veel gevallen dat we de betreffende ziektes en toxische verschijnselen goed begrijpen. Dat geldt zeker nog niet in alle gevallen, maar we maken gestaag progressie.

Veelbelovende recente ontwikkelingen

Naar mijn mening zijn er belangrijke redenen om te geloven in het potentieel van in vitro methoden. In vitro methoden kunnen gebruik maken van humaan materiaal, zodat de variatie tussen soorten (bijvoorbeeld rat versus mens) minder problematisch is. En er zijn de laatste jaren belangrijke ontwikkelingen gaande wat betreft het vertalen van de enorme complexiteit van een levend wezen naar de in vitro setting. We kunnen cellen kweken in een 3D omgeving, in plaats van als een enkele laag op de bodem van een petrischaal. Het is mogelijk om uit stamcellen (met het vermogen om verschillende celtypen te vormen) mini-organen (organoïden) te laten groeien. We kunnen door middel van micro-fluidics heel kleine vloeistofstromen realiseren in fijne buisjes die lijken op menselijke bloedvaten en die nodig zijn om cellen zich te laten gedragen zoals zij dat doen in het menselijk lichaam. Deze technieken kunnen we gebruiken om een Organ-on-a-Chip (OOC) te maken; een gesimuleerd orgaan bestaande uit cellen (meerdere typen zijn mogelijk) of organoïden op een 3D geprinte structuur (scaffold) >>



*Een maas gemaakt met 'melt-electro-writing', een vorm van 3D printen (Universiteit Utrecht); bootst de extracellulaire matrix na en kan worden gebruikt om cellen op te kweken in de gewenste vorm.
Foto door Ivar Pel.*

die worden blootgesteld aan een teststof via heel fijne buisjes.

We kunnen verschillende van dergelijke systemen aan elkaar koppelen om de effecten in orgaan-systemen en hun onderlinge interacties te simuleren; zo kan een teststof in een darm-OOC worden gebracht ('orale blootstelling'), waarna deze wordt opgenomen en naar een lever-OOC wordt getransporteerd, waar de teststof al dan niet wordt omgezet in metaboliëten. Deze gaan vervolgens richting een nier-OOC, die fungeert als een barrière en specifieke metaboliëten er uifiltreert en als het ware 'uitscheidt' via wat we dan beschouwen als urine.

De mogelijke toepassingen zijn groot: hierbij kan uiteraard worden gedacht aan veiligheidstests voor chemische stoffen en medicijnen, maar ook aan ziektemodellen om nieuwe behandelingen te testen, aan diagnostische tests voor ziekteverschijnselen (om welke ziekte gaat het?) en aan farmaco-kinetische tests die trachten te voorspellen hoe een medicijn zich gedraagt in het lichaam.

Er wordt ook hard gewerkt aan geavanceerde in silico (= computer-) modellen om in vitro resultaten om te zetten naar te verwachten effecten in de mens. Ook deze kunnen worden gekoppeld aan de eerder genoemde innovaties; je gaat dan modelleren op basis van uitkomsten van in vitro tests. Het ultieme doel (op dit moment een stip op de horizon, een lange termijn doel) is hier het ontwikkelen van een "virtuele mens", een soort computermodel waar je bijvoorbeeld een structuurformule of een molecuulformule invoert (met wellicht wat fysico-chemische eigenschappen, zoals smeltpunt, dampdruk, et cetera) en de beoogde toepassing. Vervolgens komt er uit het model een virtueel A4'tje rollen waar op staat wat de risico's zijn voor de mens en voor een medicijn of dit werkzaam gaat zijn.

Een heel recent voorbeeld van een geavanceerde in vitro methode met een groot voorspellend potentieel voor de mens is een methode om de werkzaamheid van medicijnen voor patiënten met taaislijmziekte te testen. Dit is een heel nare aandoening met een grote negatieve invloed op de levensverwachting en de kwaliteit van leven. Wat er bij het UMC Utrecht is bedacht, is een methode om stamcellen uit de endeldarm van patiënten te halen en deze te laten uitgroeien tot mini-organen (de eerder genoemde organoïden). Deze organoïden kun je vervolgens blootstellen aan verschillende stoffen die worden gebruikt als behandeloptie voor

»

taaislijmziekte; de resultaten blijken voorspellend te zijn voor hoe goed de patiënten reageren op deze behandelopties [11]. Met een proefdier test zou dit niet kunnen.

En wat biedt U-AIM?

Als expertise-centrum biedt U-AIM een gevarieerde portefeuille met innovatieve in vitro testmethoden (waaronder verschillende organoïden en Organs-on-a-Chip) en een aantal technieken om nieuwe modellen te ontwikkelen in samenwerking met de betrokken partijen. Een voorbeeld hiervan is een geavanceerde 3D print-faciliteit waar verschillende celtypen kunnen worden geprint in een "bio-inkt" (een soort gel waarin cellen kunnen overleven en delen) op een 3D structuur. Er is ook een technische expertisegroep die de structuren ontwikkelt voor Organ-on-a-Chip en de fijne pompjes en buisjes die nodig zijn om micro-fluidics (hele kleine vloeistofstromen) mogelijk te maken. Er kan via de connectie met het UMC worden gewerkt met humaan patiënt-materiaal en er zijn faciliteiten om cellen genetisch aan te passen.

U-AIM wil voor bedrijven een onestopshop worden, waar de ontwikkeling, validatie en implementatie van innovatieve in vitro methoden wordt verzorgd van A tot Z. Ook onderzoekers kunnen bij U-AIM terecht met vragen over bijvoorbeeld het marktpotentieel van de door hen ontwikkelde modellen en wat er voor nodig is om een model verder te ontwikkelen. Daarnaast zal er worden bijgedragen aan bewustwording door het opstarten van een onderwijsprogramma dat specifiek is gericht op de 3V's en het periodiek organiseren van publieke lezingen.

Dank voor jullie aandacht, wellicht tot ziens!

Damiën van Berlo, Scientific Programme Officer voor U-AIM

- 1 <https://www.rijksoverheid.nl/documenten/kamerstukken/2016/12/15/kamerbrief-voortgangsrapportage-plan-van-aanpak-dierproeven-en-alternatieven>
- 2 <https://www.rijksoverheid.nl/regering/bewindspersonen/carola-schouten/documenten/kamerstukken/2018/06/01/kamerbrief-over-testen-zonder-proefdieren>
- 3 <https://www.uu.nl/en/research/life-sciences/hubs/utrecht-advanced-in-vitro-models-hub>
- 4 Knight A, Bailey J, Balcombe J. Animal carcinogenicity studies: 1. Poor human predictivity. *Altern Lab Anim.* 2006 Feb;34(1):19-27.
- 5 Tomatis L, Wilbourn L: Evaluation of carcinogenic risk to humans: the experience of IARC. In *New Frontiers in Cancer Causation* Edited by: Iversen. Washington, DC: Taylor and Francis; 2003:371-387.
- 6 FDA Issues Advice to Make Earliest Stages Of Clinical Drug Development More Efficient <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2006/NEW01296.html>
- 7 Shanks N, Greek R, Greek J. Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanit Med.* 2009 Jan 15;4:2. doi: 10.1186/1747-5341-4-2.
- 8 van Meer PJ, Kooijman M, Gispens-de Wied CC, Moors EH, Schellekens H. The ability of animal studies to detect serious post marketing adverse events is limited. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2012 Dec;64(3):345-9. doi: 10.1016/j.yrtph.2012.09.002.
- 9 Hwang TJ, Carpenter D, Lauffenburger JC, Wang B, Franklin JM, Kesselheim AS. Failure of Investigational Drugs in Late-Stage Clinical Development and Publication of Trial Results. *JAMA Intern Med.* 2016 Dec 1;176(12):1826-1833. doi: 10.1001/jamainternmed.2016.6008.
- 10 De Keyser, J., G. Sutter & G. Lutten. 1999. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *Trends Neurosci.* 22:535-540.
- 11 Berkers G, van Mourik P, Vonk AM, Kruisselbrink E, Dekkers JF, de Winter-de Groot KM, Arets HGM, Marck-van der Wilt REP, Dijkema JS, Vanderschuren MM, Houwen RHJ, Heijerman HGM, van de Graaf EA, Elias SG, Majoor CJ, Koppelman GH, Roukema J, Bakker M, Janssens HM, van der Meer R, Vries RGJ, Clevers HC, de Jonge HR, Beekman JM, van der Ent CK. Rectal Organoids Enable Personalized Treatment of Cystic Fibrosis. *Cell Rep.* 2019 Feb 12;26(7):1701-1708.e3. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.068.

«