

INNOVATIVE TESTING

GRENZEN

VERLEGGEN &

BRUGGEN

BOUWEN

SLIMMER TESTEN VAN DE
BIOLOGISCHE VEILIGHEID EN
EFFECTIVITEIT VAN STOFFEN

NIEUWE OPLOSSINGEN VOOR OUDE UITDAGINGEN

- 1. INLEIDING
INNOVATIVE TESTING IN
LIFE SCIENCES & CHEMISTRY** [9](#)
- 2. OVER DE ACHTERGROND VAN
AANVAARDBARE RISICO'S** [13](#)
- 3. INNOVATIVE TESTING IN
MEDICIJNONTWIKKELING:
WERKING VERSUS TOXICITEIT** [21](#)
- 4. OVER OUDE GRENZEN EN NIEUWE
BRUGGEN IN RISK ASSESSMENT** [33](#)
- 5. INNOVATIVE TESTING AAN DE
HOGESCHOOL: LECTORATEN MET
EEN BRUGFUNCTIE** [43](#)

Dankwoord [51](#)

CV [53](#)

Referentielijst [54](#)

VEILIG EN VERANTWOORD VERNIEUWEN

1. INLEIDING
INNOVATIVE TESTING IN
LIFE SCIENCES & CHEMISTRY [63](#)
2. DIERPROEVEN EEN 'NOODZAKELIJK
KWAAD'? [67](#)
3. KAN HET OOK ANDERS? WAT ZIJN DE
'ALTERNATIEVEN'? [75](#)
4. RECENTE ONTWIKKELINGEN RONDOM
HET BELEID ALTERNATIEVEN VOOR
DIERPROEVEN [79](#)
5. WETGEVING EN DE ONTWIKKELING
VAN NIEUWE STOFFEN [7](#)
6. VALIDATIE EN ACCEPTATIE VAN
ALTERNATIEVEN; WAT ZIJN DE
OBSTAKELS? [83](#)
7. HOE KUNNEN WE DE TOEPASSING
VAN ALTERNATIEVE METHODEN
VERSNELLEN? [89](#)

8. WAAR GAAN WE NAAR TOE?
INNOVATIEF TESTEN HOE DOE JE DAT?

[107](#)

9. 'CHANGING MINDS'; EDUCATIE
VAN NIEUWE GEESTEN VOOR
ALTERNATIEVEN [113](#)

Dankwoord [121](#)

CV [123](#)

Referentielijst [124](#)

VEILIG EN VERANTWOORD VERNIEUWEN

“IN HET WERKVELD VAN LIFE SCIENCES & CHEMISTRY IS EEN INNOVATIEVE REVOLUTIE GAANDE”

pag
9

hoofdstuk 1
Inleiding

lectoraat
Innovative Testing
in Life Sciences &
Chemistry

onderwerp
Innovative Testing
Grenzen verleggen &
bruggen bouwen

1 / INLEIDING

Geachte aanwezigen,

Mijn openbare les gaat over *Innovative testing*, letterlijk vertaald Vernieuwend Testen.

In het werkveld van *Life Sciences & Chemistry* heeft *Innovative testing* te maken met het testen van stoffen op hun werking en veiligheid. Met stoffen wordt hier bedoeld alle mogelijke chemicaliën waar aan we blootgesteld worden, zoals chemicaliën in onze leef- en werkomgeving, medicijnen (inclusief *biologicals*), maar ook stoffen in de voeding (inclusief voedselbestanddelen en natuurlijke stoffen). Mijn les zal echter voornamelijk gaan over de laatste twee categorieën, medicijnen en stoffen in de voeding.

Sinds de jaren 80 van de vorige eeuw zijn er conceptuele en vooral technische veranderingen in gang gekomen op het gebied van biologie en chemie. Belangrijke aanleidingen daartoe waren de ontwikkelingen in de moleculaire biologie met als het meest opmerkelijke uitvloeisel het ontrafelen van met menselijk genoom. Een andere belangrijke ontwikkeling betreft de toepassing van informaticamogelijkheden in de biologie en scheikunde. Voeg daar nog bij de technische ontdekkingen om vele parameters in steeds grotere aantallen tegelijkertijd te meten en het beeld van een revolutie in *Life Sciences & Chemistry* is compleet. Deze revolutie heeft al bijgedragen tot het verder ontrafelen van tal van biologische processen en tot het ontwerpen van nieuwe medicijnen (zoals *biologicals*). Naar verwachting van velen zal de bereikte innovatie ook in de komende decennia bijdragen aan de zoektocht naar nieuwe geneesmiddelen en therapeutische mogelijkheden.

Iets eerder al, vanaf de jaren zestig en zeventig van de vorige eeuw is het bewustzijn gegroeid dat het erg belangrijk is de veiligheid van de stoffen waaraan we blootgesteld worden goed te onderzoeken. Voor geneesmiddelen geldt dat dit nadrukkelijk moet gebeuren tegen de achtergrond van het effect dat gewenst is: de farmacologische werking van het geneesmiddel. De uitdaging die voor ons ligt is om het testen van zowel de werking als de toxiciteit te verbeteren en te vernieuwen, met gebruikmaking van de revolutionaire ontwikkelingen in de biologie en chemie.

Maar *innovative testing* hoeft niet alleen uit te gaan van de nieuwste technieken. Het ligt veel meer voor de hand om verschillende testen, oud en nieuw, op een slimme wijze te integreren in een voorspellende teststrategie. In het meest ideale geval zou dit kunnen door middel van een strategie die voorspellend is voor de werking en tegelijkertijd voor de veiligheid van stoffen.

De mogelijkheid om verschillende testen slim te kunnen combineren en tevens om de complexiteit van de uitkomsten goed te kunnen interpreteren is vanzelfsprekend afhankelijk van de juiste kennis van zaken bij de verantwoordelijke mensen. Die mensen zijn bijvoorbeeld de onderzoekers die het werk uitvoeren of er, op de een of andere manier, bij betrokken zijn. Het blijft dan ook van groot belang om jonge mensen op te leiden tot nieuwe onderzoekers en beoordelaars op het terrein van *innovative testing*. Hier ligt een belangrijke taak van de hogeschool. Ik kom daar in hoofdstuk 5 op terug.

Ik wil in mijn openbare les eerst uiteenzetten waarom het zo belangrijk is om vast te stellen wat de werking en veiligheid van stoffen is. Vervolgens wil ik beschrijven welke innovaties op dit moment al plaatsvinden, in de toxicologie en de farmacologie. Dit wil ik doen om aan te geven waar de parallellen en mogelijkheden voor synergie liggen. Daarna zal ik aan de hand van een aantal voorbeelden aangeven tegen welke grenzen men zoal aanloopt bij het testen van werking en veiligheid van stoffen,

om daarbij ook aan te geven dat er duidelijk aanwijzingen zijn voor het vervagen van grenzen tussen farmacologie en toxicologie. Tot slot zal ik aangeven welke rol het Kenniscentrum Life Sciences & Chemistry van Hogeschool Utrecht op het gebied van onderzoek én onderwijs in het werkveld van *Innovative testing in Life Sciences & Chemistry* wil gaan spelen.

“ALLEEN WANNEER RISICO'S BEKEND ZIJN, KUNNEN ZE OP AANVAARDBAARHEID BEOORDEELD WORDEN”

pag
13

hoofdstuk 2
Over de achtergrond
van aanvaardbare
risico's

lectoraat
Innovative Testing
in Life Sciences &
Chemistry

onderwerp
Innovative Testing
Grenzen verleggen &
bruggen bouwen

2 / OVER DE ACHTERGROND VAN AANVAARDBARE RISICO'S

Dat het leven vol risico's zit is een open deur. Waar het in dit hoofdstuk omgaat, is dat mensen daar heel dubbel mee omgaan. Sommige risico's worden door mensen, vooral de avontuurlijke en nieuwsgierige, bewust en zelfs met overtuiging genomen. Denk hierbij aan ongelukken door *bungeejumping* of het krijgen van longkanker door roken. Andere risico's worden als volstrekt onaanvaardbaar ervaren. Een huidirritatie-reactie als gevolg van cosmeticaproducten of ongewenste bijwerkingen van sommige medicijnen zijn daarvan voorbeelden. De aanvaardbaarheid van risico's heeft te maken met risico perceptie, waarbij factoren als zichtbaarheid en controleerbaarheid van belang zijn. Om na te gaan of een risico aanvaardbaar is, moet het bekend zijn in de context waarin het zich voordoet. Dit hoofdstuk gaat over hoe het vaststellen van risico's in het geval van stoffen plaatsvindt.

De Westerse wereld is tegelijkertijd risicovol en veilig.
Het in kaart brengen van risico's van stoffen houdt veel mensen bezig. Ten aanzien van de gezondheid zijn dat bijvoorbeeld overheidsinstanties zoals het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Voedsel en Waren Autoriteit (VWA), Keuringsdiensten van Waren, onderzoekorganisaties zoals TNO, maar ook internationale organisaties zoals de *World Health Organization* (WHO). Ook op academisch gebied is er veel aandacht voor risico's getuige het bestaan van bijvoorbeeld het *Institute for Risk Assessment Sciences* (IRAS) van de Universiteit Utrecht en het Julius centrum van het Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU). Door de inzet van deze en tal van andere organisaties zoals *European Medicines Agency* (EMA), *European Food Safety Agency* (EFSA), *Food & Drug Association* (FDA), kan gesteld worden dat het leven als zodanig (voor de gemiddelde Westerse mens althans) nog nooit zo veilig is geweest als tegenwoordig. Het beste is dat te zien aan de toename van

de levensverwachting van de mens, die gedurende de laatste 100 jaar bijna verdubbeld is. In 2007 was de levensverwachting in Nederland voor mannen ongeveer 78 jaar en voor vrouwen iets hoger, ongeveer 82,3 jaar. De mogelijk belangrijkere gezonde levensverwachting in Nederland is ook hoog: rond de 70 jaren voor zowel mannen als vrouwen (op basis van ervaren en gemeten lichamelijke en geestelijke gezondheid, zie website van het Nationaal Kompas, RIVM)¹.

Toch is het een voortdurende uitdaging om gezond te blijven, en vooral zo oud mogelijk gezond te blijven. Dat gaat niet vanzelf, het leven is immers vol risico's en verleidingen zoals vet voedsel, zoete frisdranken, alcohol, en natuurlijk roken. Bovendien worden mensen soms gedurende lange periodes blootgesteld aan allerlei stoffen, bijvoorbeeld op de werkplek maar ook thuis. Door het RIVM is de bijdrage van verschillende factoren aan verloren levensjaren geschat en daaruit blijkt dat roken (20,9 jaren), verhoogde bloeddruk (10,8 jaren), ongezonde voeding (9,1 jaren) en overgewicht (5,8 jaren) de belangrijkste boosdoeners zijn. Milieufactoren (waaronder luchtvervuiling) dragen voor 2 tot 5 % bij aan de zogenaamde ziektelast. Blootstelling aan chemische stoffen op de werkplek is verantwoordelijk voor 1% van de totale ziektelast in Nederland¹.

Gezondheidsrisico's voor de Westerse (Europese) mens betreffen allerlei ouderdomsaandoeningen zoals hart- en vaatziekten, kanker, geestesziekten, en chronische ontstekingsziekten^{1,2}. Voor het bestrijden van genoemde ziekten is men voortdurend op zoek naar geschikte medicijnen, en zoals bekend, hebben ook medicijnen regelmatig bijwerkingen. Die bijwerkingen zijn vaak onvermijdbaar, wat niet heel ernstig hoeft te zijn zolang de voordelen maar opwegen tegen de nadelen. Hoe dan ook, niet alleen de werking, maar ook het risico van medicijnen moet in kaart gebracht worden. Zeker als men bedenkt dat per jaar (in de Verenigde Staten) 2,1 miljoen ziektegevallen en 100.000 doden te betreuren zijn ten gevolge van medicijngebruik³.

Het paradigma van de risicobeoordeling.

Het gezondheidsrisico van stoffen wordt bepaald volgens een werkmodel of paradigma dat aangeduid wordt met de term *risk assessment* of in goed Nederlands risicobeoordeling. Het paradigma is vooral bekend vanuit de toxicologische risicobeoordeling van chemicaliën uit milieu en op de werkplek en gaat ervan uit dat voor het bepalen van het gezondheidsrisico een aantal min of meer onafhankelijk te bepalen factoren bekend moeten zijn. In ieder geval moet zowel het potentiële gevaar (ook wel "hazard" genoemd) als de actuele blootstelling (expositie) van de stof bekend zijn. Bovendien zijn gegevens nodig over zaken als gevoeligheid van verschillende mensen voor het gevaar, maar ook over omstandigheden van blootstelling en andere niet aan de stof gerelateerde factoren (allen tezamen risicofactoren genoemd).

De toxicologen onderzoeken of een stof een bepaald ongewenst effect heeft op een biologische systeem. Bovendien stellen ze vast bij welke dosis of blootstellingconcentratie het effect optreedt. Hierbij worden allerlei methoden ingezet, maar uiteindelijk zijn in veel gevallen dierproeven vereist, zeker indien complexe systemische effecten onderzocht moeten worden. In een dierproef kan immers het effect op het biologische systeem met al zijn diverse interacties onderzocht worden en bovendien kan het lot van de stof (inclusief de interne concentraties) achterhaald worden.

De dosis die in dierproeven geen ongewenste effecten laat zien, wordt ook wel de *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL) of *No Toxic Effect Level* (NTEL) genoemd. Deze waarden worden gebruikt om de veilige dosis of blootstellingsconcentratie voor de mens te bepalen. De veilige dosis wordt berekend door de NOAEL te vermenigvuldigen met een veiligheidsfactor. De veiligheidsfactor is 100 tot 1000, afhankelijk van de beschikbare informatie en de ernst van de toxiciteit.

De actuele blootstelling kan bepaald worden door met behulp van de omgevingsconcentratie te schatten hoeveel er mogelijk

opgenomen wordt. Beter zou zijn om de blootstelling per persoon daadwerkelijk te meten. Een toxicoloog zou het liefst de interne blootstellingsconcentratie willen weten, dat wil zeggen de concentratie in het orgaan of bij de cel waar het biologische effect verwacht wordt. Dit geeft namelijk de meeste directe informatie over de relatie tussen dosis en effect. Het bepalen van de interne dosis is niet eenvoudig maar kan tegenwoordig steeds beter met behulp van computermodellen die gebaseerd zijn op *pharmacokinetic-pharmacodynamic* (PB/PK) modellen⁴.

Bij het uiteindelijk vaststellen van het risico worden ook verschillende risicofactoren betrokken. Risicofactoren zijn bijvoorbeeld individuele gevoeligheden van mensen (ziekten, geslacht, leeftijd), bepaalde werkomstandigheden, microbiële infecties, maar ook leefomstandigheden en gewoonten zoals roken en alcoholgebruik.

Risicobeoordeling is een interactieve bezigheid waarbij samenwerking tussen onderzoekers met uiteenlopende expertises nodig is. Hoe de risicobeoordeling uiteindelijk gebruikt wordt en bijdraagt aan risico management en bescherming van de gezondheid van de bevolking is in belangrijke mate de verantwoordelijkheid van werkgevers, bestuurders en regelgevers. Hierbij spelen ook tal van andere (ook economische) factoren een rol.

Innovatie van onderdelen van het risk assessment paradigma is noodzakelijk.

Het *risk assessment* paradigma zoals hierboven beschreven is aan vernieuwing toe. Alle drie de onderdelen van het paradigma (vaststellen van toxiciteit, vaststellen van blootstelling en de uiteindelijke risicobeoordeling) worden dan ook al enige tijd tegen het licht gehouden. Een belangrijke reden voor vernieuwing heeft te maken met het onderwerp dat mijn collega-lector Cyrille Krul in haar les zal behandelen, namelijk de wens en noodzaak om proefdierexperimenten te verminderen, te verfijnen of te vervangen. Ik ga in mijn les hier niet specifiek op in.

In de literatuur worden meerdere opties genoemd die een bijdrage zouden kunnen leveren aan de verbetering van het proces van de risicobeoordeling. Ze worden hier puntsgewijs vermeld.

1-Betere toepassing van vergelijkend onderzoek tussen klassen van stoffen op basis van fysisch-chemische eigenschappen, bekend onder de verzamelnaam (*Quantitative*) *Structure Activity Relationships*, (Q)SAR). Er wordt al jaren onderzoek gedaan naar de relatie van fysisch-chemische stoffeigenschappen en biologische effecten en er zijn ook tal van computermodellen beschikbaar voor allerlei specifieke toepassingen⁵. Deze technieken zouden meer toepasbaar gemaakt moeten worden om toxiciteit in de mens vast te stellen.

2-Toepassing van *systems biology* om opname (absorptie), verdeling (distributie), stofwisseling (metabolisme) en excretie (samen afgekort als ADME) en toxiciteit vast te stellen, samen wel aangeduid met ADMET⁶. "*Systems biology*" staat voor een aanpak waarmee inzicht verkregen kan worden in het complete biologische systeem op een bepaald moment en in reactie op een bepaalde stimulus. Hierbij wordt met een veelheid aan technieken geïntegreerde informatie verkregen ten aanzien van activiteit en/of hoeveelheid van genen, eiwitten, vetten en producten van stofwisselingsprocessen. In de toxicologie spreekt men bij het bepalen van gen-activatie patronen van toxicogenomics. Door de grote hoeveelheid data die met behulp van "*systems biology*" verkregen worden zijn voor de interpretatie van uiteindelijke biologische effecten computermodellen onmisbaar. De verwachting is dat met "*systems biology*" een beter inzicht verkregen zal worden in de effecten van stoffen op het niveau van cellen, organen en het gehele organisme.

3-Bredere toepassing van effect-onderzoek op cellen of weefsels van menselijke oorsprong (*in vitro* onderzoek). Relevante cellen, cellijnen, of weefsel van humane oorsprong zouden veel meer dan nu nog het geval is ingezet kunnen worden om de toxiciteit van stoffen vast te stellen. Voor de vertaling van dierproeven, is informatie ten aanzien van effecten op cellen uit dieren

(bijvoorbeeld met cellijnen) ook zeer waardevol (zie ook hoofdstuk 5, voorbeeld met TGN1412).

4-Ontwikkeling van proefdierexperimenten die sneller de nodige specifiekere antwoorden geven. *Dierexperimenten blijven voorlopig noodzakelijk, vooral om complexe systemische effecten van stoffen vast te stellen, zoals effecten op het immuunsysteem en reproductie-effecten. Maar door de toenemende kennis ten aanzien van de biologie, met name fysiologie van mens en dier, is het wellicht in de toekomst mogelijk om ook deze (en andere) complexe aandoeningen met behulp van slimme stapsgewijze strategieën vast te stellen (zie hoofdstuk 5, voorbeeld van medicijnallergie).*

5-Bredere inzet van *in silico* (computer) modellen die de kinetiek van stoffen in het lichaam beschrijven uitgaande van relevante mechanismen. Deze aanpak staat bekend onder de naam: *"Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modelling"*. De computermodellen maken het mogelijk de verdeling en het gedrag van een stof in het lichaam in relatie tot het verwachte of beoogde (patho)-fysiologische effect te beschrijven⁴.

6-Meer gericht epidemiologisch en klinisch onderzoek, met relevante biomarkers. De epidemiologie is een relatief jonge wetenschap die zich snel ontwikkelt. Het zou goed zijn om de komende jaren meer nadruk dan nu te leggen op het ontwikkelen van relevante (*"mechanism-based"*) biomarkers die gebruikt kunnen worden om humane *in vitro* gegevens te vertalen naar de mens. De verwachting is dat *"systems biology"* een belangrijke bijdrage kan leveren in deze vorm van translationeel onderzoek.

7-Verbeteren van informatie-uitwisseling tussen verschillende belanghebbende⁷. Een grote uitdaging is om de (met name *precompetitieve*) informatie die her en der aanwezig is in data-opslag van bedrijven beschikbaar te maken voor algemeen gebruik. Dat gebeurt nog veel te weinig. Elk van de genoemde vernieuwingen op zich zal niet het gewenste resultaat hebben.

Alleen een geïntegreerde aanpak van bovengenoemde opties zal uiteindelijk bijdragen tot een beter begrip van biologische effecten van stoffen en daarmee van causale relaties tussen stofblootstelling en gezondheidseffecten. Zo is de verwachting dat *systems biology* bijdraagt aan het identificeren van betere biomarkers⁸, aan *in vitro* ADME onderzoek⁹ en aan beter onderbouwing van *in vitro* en *in vivo* onderzoek^{10,11}.

Zoals al gemeld zijn computerprogramma's onmisbaar om de brei aan informatie die door middel van de voorgestelde geïntegreerde risicobeoordeling verkregen wordt helder te maken. Het gebruik van computerprogramma's in de biologie wordt aangeduid met bioinformatica. Maar de uiteindelijk verkregen informatie moet wel nog geïnterpreteerd en praktisch vertaald kunnen worden. Bijvoorbeeld door een onderzoeker of een risicobeoordelaar. Dat vraagt om een brede en tegelijkertijd grondige biologische en chemische kennis, en eveneens om een goede samenwerking tussen de verschillende disciplines. Goed onderwijs speelt hierbij een belangrijke rol.

Hoe dan ook innovatie in de risicobeoordeling is een grote uitdaging, waarbij grenzen geslecht en bruggen gebouwd moeten worden. Een van de grenzen die geslecht moet worden is de grens die nog steeds te duidelijk aanwezig is tussen het bepalen van toxiciteit (*safety* of veiligheid) en farmacologische werking (*benefit* en *efficacy*). Door de befaamde spreuk van de Zwitserse arts en theoloog Paracelsus *"Alle Ding sind Gift, und nichts ohn Gift; allein die Dosis macht, daß ein Ding kein Gift ist"* weten we immers al sinds de 15^{de} eeuw dat de werking en veiligheid van stoffen keerzijden zijn van dezelfde medaille.

Om aan te geven dat er tal van mogelijkheden zijn voor uitwisseling van informatie tussen toxicologen en farmacologen wordt in het volgende hoofdstuk ingegaan op het proces van medicijnontwikkeling.

"DE KERN VAN INNOVATIVE TESTING IS TRANSLATIONEEL ONDERZOEK"

pag
21

hoofdstuk 3
Innovative testing in
medicijnontwikkeling:
werking versus
toxiciteit

lectoraat
Innovative Testing
in Life Sciences &
Chemistry

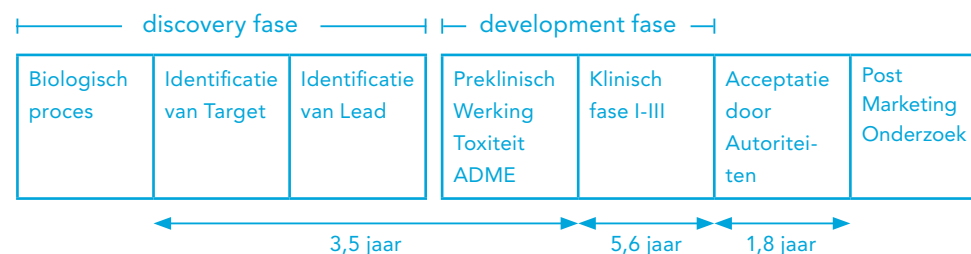
onderwerp
Innovative Testing
Grenzen verleggen &
bruggen bouwen

3 / INNOVATIVE TESTING IN MEDICIJNONTWIKKELING: WERKING VERSUS TOXICITEIT

3.1 Medicijnontwikkeling: een overzicht.

Voordat ik in ga op *innovative testing* in de wereld van de farmacologie is het goed het nu gebruikte werkmodel dat gangbaar is om tot een goedwerkend en veilig medicijn te komen tegen het licht te houden (Figuur 1)¹². Het werkmodel geeft het proces weer hoe uit een soms zeer grote verzameling van moleculen, minstens één molecuul geselecteerd wordt dat een zodanige interactie met een biologisch proces aangaat dat het een ziekte geneest.

Gangbare medicijnontwikkelingsproces



Figuur 1.
Een schematische weergave van het proces waarop ontwikkeling van medicijnen in het algemeen plaatsvindt (vooral gebaseerd op informatie uit^{12,29})

De ontwikkeling van medicijnen kent grofweg twee fasen: de *discovery* fase en de *development* fase. De eerste fase wordt ook wel aangeduid met *Research & Development* (R&D) fase. Deze fase omvat het zoeken en selecteren van nieuwe *target*-specifieke moleculen, en moet uiteindelijk leiden tot het identificeren van een zogenaamde *lead compound* of gidsstof. Indien de *lead compound*, ook wel *new chemical of molecular entities* (NCE of NME) genoemd, geschikt lijkt als kandidaat-medicijn komt de stof in de *development* fase terecht.

De *development* fase kent een preklinisch en een klinisch traject. Tijdens het preklinische traject wordt de werkzaamheid (inclusief

dosering) van de stof uitvoerig getest, bijvoorbeeld in geschikte ziektemodellen met proefdieren. Ook worden ADME en toxische eigenschappen onderzocht. Vanzelfsprekend wordt ook onderzocht of de stof wel in een vorm te brengen is die geschikt is voor toediening in de mens. De uitkomst van het preklinisch onderzoek is van groot belang, omdat op grond van die uitkomst bepaald wordt of de stof in de mens getest mag worden. De klinische fase kent 3 fases. Fase I wordt uitgevoerd met een beperkt aantal gezonde vrijwilligers en is vooral gericht op het testen van de veiligheid, ADME en PB/PK van het kandidaat-medicijn. In fase II wordt een beperkte groep patiënten blootgesteld, voornamelijk om een zogenaamde *proof-of-concept* vast te stellen, met andere woorden om vast te stellen of de stof ook überhaupt werkzaam is in patiënten. Beide fases kunnen ook weer verder opgesplitst worden al naar gelang er meer informatie gewenst is. Fase III, met grote groepen patiënten, is de fase waarin de werking en veiligheid van de stof bevestigd moet worden. Na deze fase moeten er zoveel gegevens beschikbaar zijn dat het medicijn met alle vertrouwen op de markt toegelaten kan worden. Uiteindelijk beoordelen organisaties als de Europese EMEA en de Amerikaanse FDA op grond van een dossier met alle benodigde informatie of een nieuw medicijn inderdaad op de markt gebracht mag worden.

Is het medicijn op de markt dan volgt er nog de fase IV, of postmarketing surveillance fase, die erop gericht is voortdurend patiëntgegevens te verzamelen ten aanzien van werking en veiligheid van het medicijn. In fase IV komen regelmatig nog zeldzame bijwerkingen zoals medicijnallergie aan het licht.

Het proces zoals hier beschreven is maar een globale indicatie van hoe het in werkelijkheid gaat. Zo kunnen de verschillende fases naar believen nog verder opgesplitst worden om meer informatie te vergaren. Het komt ook voor dat een medicijn eerder in een patiënt getest wordt, zoals in het geval van ernstige aandoeningen waarvoor nog geen medicijn beschikbaar is.

Toename van investeringen: droge pijn en knelpunten.
De investeringen in tijd en geld die gepaard gaan met medicijnontwikkeling zijn enorm en nemen toe door allerlei redenen, waaronder hogere ontwikkelingskosten en veiligheidseisen. Het ontwikkelen van één medicijn van ontdekking tot marktintroductie volgens het proces zoals hierboven beschreven neemt naar schatting 8 tot 12 jaar in beslag en kost rond \$800 miljoen^{13,14}. De kosten zijn de afgelopen 20 jaar ongeveer verdubbeld, maar het aantal nieuwe medicijnen dat voor registratie aangemeld werd in die periode is redelijk constant gebleven: per jaar ongeveer 20¹⁵. Indien de trend in kostenstijging zich op dezelfde wijze voortzet zou het kunnen zijn dat de kosten per ontwikkeld medicijn oplopen tot rond \$1,9 miljard in 2013. Het falen van een medicijn op ongewenste bijwerkingen kan dramatische gevolgen hebben voor een farmaceutisch bedrijf, zeker als dat in fase III of zelfs na marktintroductie gebeurt.

Bij farmaceutische bedrijven spreekt men over “de pijn” als men het heeft over hoeveel NCE er in een *development* fase zitten. Momenteel maakt de farmaceutische industrie zich zorgen aangezien de toename in investeringen niet leidt tot een beter gevulde pijn, terwijl een aantal langdurige patenten afloopt.

De belangrijkste redenen voor het mislukken van een medicijn, ook wel *attrition* genoemd, hebben te maken met toxiciteit en klinische veiligheid (verantwoordelijk voor ongeveer 30% van de *attrition*), en het uiteindelijk ontbreken van effectieve werkzaamheid (ongeveer 30% van de *attrition*)¹⁶. Volgens een retrospectief onderzoek van een aantal farmaceutische bedrijven zijn effecten op het immuunsysteem een belangrijke reden (60% van alle gevallen) voor het terugtrekken van stoffen tijdens de preklinische ontwikkelingsfase¹⁷. Het gaat hierbij om huideffecten, vaatwandontstekingen, fototoxiciteit en veranderingen in lymfocyt-aantallen. Veel gaat nog mis in de klinische fasen, het geen blijkt uit het feit dat slechts iets meer dan 10% van de kandidaat-medicijnen deze fasen doorstaan¹⁶.

Samenvattend: de farmaceutische pijplijn is niet voldoende gevuld gezien de toenemende investeringen, de mate van falen van een medicijn tijdens ontwikkeling is veel te hoog en tot slot, de tijd van de echte blockbuster-medicijnen (met een jaaropbrengst van meer dan \$1 miljard) lijkt voorbij.

3.2 Innovaties in de medicijnontwikkeling.

De farmaceutische industrie is al een tijd volop in beweging om het hele proces van medicijnontwikkeling te innoveren. In januari van dit jaar is er door het Nederlandse *Top Institute Pharma* (TIPharma) samen met de *European Federation for Pharmaceutical Sciences* (EUFEPS) een symposium dit thema gehouden, met als titel *"Bottlenecks identification in drug discovery... And solutions please!"* Een positieve titel en waarschijnlijk met reden want er zijn tal van interessante en veelbelovende innovaties gaande die moeten leiden tot nieuwe, en meer gerichte medicijnen.

3.2.1 Van screenen naar design.

In elk van de fases van de medicijnontwikkeling zijn innovaties gaande. Zo wordt er steeds gericht gezocht naar nieuwe *lead compounds*. Het zoeken naar *lead compounds* kan gedaan worden door middel van *screening* van grote aantallen stoffen (10 duizenden) op binding aan een target molecuul of op een bepaald biologisch effect (op specifieke cellulaire systemen). Maar moleculen kunnen ook heel gericht ontworpen worden. In het extreme geval kan dit gedaan worden met een techniek die *Fragment-Based Drug Discovery* (FBDD) genoemd wordt. Door middel van deze techniek worden met behulp van computermodellen nieuwe moleculen ontworpen die heel specifiek binden aan een bepaalde *target*, uitgaande van de binding van onderdelen (fragmenten) van (bekende) moleculen aan die *target*. Pas daarna wordt de stof gesynthetiseerd¹⁸.

3.2.2 Natuurlijke bronnen.

De laatste jaren is een hernieuwde belangstelling ontstaan voor natuurlijke stoffen als bron voor nieuwe medicijnen. Hernieuwd, omdat farmacognosie, als de kennis van natuurlijk voorkomende

medicijnen, eigenlijk de basis is van de huidige farmacologie en medicijnontwikkeling. De eerste leerstoel in de farmacologie in Nederland, geïnstalleerd door Koningin Wilhelmina in Utrecht in 1908 en bezet door Rudolf Magnus, was niet voor niets gericht op de farmacognosie¹⁹.

Natuurlijke bronnen zijn voornamelijk planten, maar in feite kan elke natuurlijke bron interessante stoffen opleveren. Zo zijn interessante medicijnen geïsoleerd uit bijvoorbeeld schimmels, sponsdieren, insecten, amfibieën en reptielen. Farmacognosie kan veelal leunen op oude bronnen van kennis, zoals de traditionele Chinese geneeskunst. Tegenwoordig wordt de farmacognosie gecombineerd met moderne technieken, zoals *systems biology*, geavanceerde isolatie-, detectie- en synthesesmogelijkheden en hoogwaardige screeningsmethoden^{20,21}. Maar het komt er nog steeds op neer dat stoffen eerst uit de bron geëxtraheerd worden en vervolgens op biologische activiteit getest worden. De grote uitdaging bij natuurlijke medicijnen is de identificatie van de juiste actieve component(en).

De farmacognosie blijkt ook steeds meer invloed te krijgen op de voedingsindustrie, want ook onze voeding wordt steeds vaker gezien als bron van farmacologisch werkzame bestanddelen. In dit verband worden termen gebruikt variërend van *functional foods* tot *nutraceuticals*. Ook dit is niets nieuws: de Griekse wijsgeer Hippocrates was al bekend met het feit dat voeding ook medicinale werking kan hebben. Tegenwoordig is iedereen bekend met reclames die de meest uiteenlopende voedingsbestanddelen aanprijzen als gezondheidsbevorderend of zelfs therapeutisch. Denk aan de onverzadigde vetzuren (in olijfolie en vis) en cholesterolverlagende margarines, verschillende anti-oxiderende stoffen uit de voeding zoals vitamines, lycopenen (uit tomaten), etc. De interesse voor het *food-pharma* concept heeft recent geleid tot het installeren van twee nieuwe hoogleraren: Prof. Dr. R. Witkamp (Wageningen Universiteit & Research Centrum, WUR) en Prof. Dr. J. Garssen (University Institute Pharmaceutical Sciences (UIPS), Universiteit Utrecht).

3.2.3 Biopharmaceuticals.

Biopharmaceuticals of *biologicals* vormen een nieuwe bron van geneesmiddelen. *Biologicals* omvatten bijvoorbeeld stoffen die afkomstig zijn uit ons eigen lichamen zoals cytokines, enzymen, stollingseiwitten, bloed producten (zoals EPO, Erythropoëtin). Maar ook vaccins, gen-therapie-producten en stamcellen worden onder de *biologicals* gerekend. Een interessant voorbeeld van *biologicals* zijn (monoklonale) antilichamen. Antilichamen worden geproduceerd door het immuunsysteem en kunnen heel specifiek binden met een bepaald molecuul, bijvoorbeeld een bepaalde receptor op het membraan van een cel. Deze receptor kan er voor zorgen dat de betreffende cel geactiveerd, geremd of gedood (kankercel) wordt. Er zijn intussen al tal van verschillende monoklonalen, maar ook andere *biologicals* (cytokines bijvoorbeeld) goedgekeurd en in gebruik²². *Biologicals* hebben een grote vlucht genomen omdat ze tegemoet komen aan de toenemende vraag naar nieuwe, meer specifieke medicijnen. Als gevolg hiervan omvatten antilichamen thans 25% van alle medicijnen in ontwikkeling. Die vlucht kan nog groter worden in combinatie met resultaten uit de *systems biology*. In zijn FC Donder speech bij de opening van het schooljaar 2008-2009 van het *Institute Life Sciences and Chemistry*, sprak Prof. Van de Winkel, directeur van Genmab, over biologicals als een ware revolutie op medicijngebied.

3.2.4 Systems Biology, Translationeel onderzoek en Personalized Medicines.

De al eerder genoemde *systems biology approach* kan nadrukkelijk bijdragen aan de zoektocht naar nieuwe medicijnen. Door het geheel van biologische veranderingen (op het niveau van genen, eiwitten, vetten en stofwisselingsproducten) bij een ziekte in kaart te brengen, zullen nieuwe therapeutische targets gevonden worden. Bijvoorbeeld als het geheel van geactiveerde genen en gevormde eiwitten in patiënten in vergelijking tot niet-patiënten bekend is, kunnen specifieke biologicals (zoals specifiek remmende RNA moleculen of antilichamen) ontworpen worden^{23,24}. Een belangrijke kanttekening bij het heel specifiek

ontwerpen van medicijnen is dat nogal wat medicijnen (bijvoorbeeld de populaire cholesterolverlagende statines) op meerdere targets invloed hebben en toch een specifiek effect hebben in patiënten²⁴.

De geweldige aandacht voor translationeel onderzoek is direct gekoppeld aan de opkomst van *systems biology*²⁵. Door de geboden mogelijkheden van *systems biology*, zoals het genetisch screenen van patiënten, is de behoefte bij de farmacologen aan biologische monsters van patiënten toegenomen. Dit heeft ertoe bijgedragen dat laboratoriumonderzoekers veel meer in contact kwamen met artsen, en de vertaling van labbevindingen naar de patiënt ook makkelijker werd. Translationeel onderzoek wordt dan ook wel aangeduid met *bench-to-bed approach*, om aan te geven dat de bevindingen aan de laboratoriumtafel (*the bench*) direct vertaald worden naar de patiënt (*the bed*).

Systems biology heeft een geweldige vlucht genomen na het bekend worden van het gehele genenpakket van de mens, het humane genoom, in 2003. Gecombineerd met de verkregen kennis van het bepalen van genexpressie patronen is ook de mogelijkheid ontstaan om individuele verschillen op gen-niveau, de genetische variatie, beter vast te stellen. Hierdoor is het concept van *personalized medicine* of persoonsgebonden therapie ontstaan^{25,26,27}. Dit concept komt erop neer dat therapieën speciaal ontworpen worden op basis van de genetische achtergrond van de patiënt. In de meest extreme en ideale situatie zou dit kunnen betekenen dat een persoon bij zijn geboorte al een pakketje medicijnen voorgeschreven krijgt waardoor hij de rest van zijn leven gevrijwaard is van ziekten. Deze genetische variatie waarvan gebruik gemaakt wordt, berust op kleine verschillen in moleculaire bouw van genen, en wordt ook wel aangeduid met "*Single Nucleotide Polymorphisms*" afgekort als SNPs ("snips"). SNP-analyses kunnen gedaan worden voor een chromosoom maar ook voor het gehele genoom. Er wordt nu al gewerkt aan mogelijkheden om met chip technieken ongeveer 1 miljoen SNPs in een keer vast te stellen (Affymetrix). Of *personalized medicines*

inderdaad de vlucht zal nemen die door sommigen wordt voorzien, is nog maar de vraag. Maar nu al worden SNP analyses gebruikt om medicijnen gericht (dat wil zeggen efficiënter en veiliger) aan te bieden (zie hoofdstuk 4, voorbeeld medicijnallergie) op basis van genetische eigenschappen van de patiënt. Dit onderdeel van de farmacologie valt onder de farmacogenetica.

Gekoppeld aan de genoemde ontwikkelingen (translationeel medicijnonderzoek, *personalized medicines*) is de behoefte aan goede *biomarkers* enorm toegenomen²⁸. Een *biomarker* is een objectieve en relevante parameter die een goede indruk geeft van een normaal of pathologisch biologisch proces. *Biomarkers* zijn van belang voor diagnostiek maar ook voor het vaststellen van therapeutische werking van nieuwe medicijnen en voor het identificeren van gevoelige personen (bijvoorbeeld patiënten). Klassieke *biomarkers* zijn bijvoorbeeld de waarden die verkregen worden door middel van klassieke analyses op bloed, zoals suikervwaarden of de hoogte van het bloedbezinsel. Maar ook de bovengenoemde SNP analyse is een voorbeeld van een *biomarker*-techniek. Tegenwoordig krijgen ook geavanceerde beeldvormingstechnieken (*imaging* technieken) steeds meer aandacht²⁹. Deze technieken gaan zover dat men, op moleculair niveau, een beeld kan krijgen van interacties van medicijnen aan hun beoogde receptor. Opmerkelijk is dat er zo'n geweldige behoefte is aan *biomarkers* dat ook daar sprake is van een pijlpijnprobleem.

Translationeel *personalized* medicijnonderzoek heeft ook in Nederland grote aandacht, getuige het bestaan van het *Center for Translational Molecular Medicine* (CTMM) op de *HighTech*-campus in Eindhoven. Bedrijven als Philips en DSM hebben hier grote belangstelling voor.

Een translationeel onderzoeksproject waar ikzelf vanuit mijn positie bij het IRAS bij betrokken ben gaat over voedselallergie. Dat onderzoek vindt plaats in de context van een van de TNO kenniscentra, *Center for Food Allergy* (CFA). Hier wordt in samenwerking met onderzoekers van TNO (projectleider

Dr. G. Houben), UMCU (Groep van Prof. C. Bruijnzeel) en ook van UIPS (Groep Dr. J. Garssen) en het RIVM (Groep Prof. H. van Loveren) onderzoek gedaan naar risico's van, en therapeutische mogelijkheden voor voedselallergie. Bij dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van muizenmodellen voor voedselallergie, humaan *in vitro* werk en patiëntenonderzoek.

Innovatief testen van werking en toxiciteit.

Relevante processen op moleculair en cellulair niveau moeten vertaalbaar zijn naar (patho)fysiologische processen op het niveau van het hele organisme. Biologische effecten zijn in sommige gevallen echter zo complex dat een dergelijke vertaling niet direct te maken is. Het is een uitdaging om een strategie van testsystemen te ontwerpen die het toelaat zowel de effectiviteit als de toxiciteit van een NCE te testen. Wederom zou kennis verkregen met *systems biology* ten aanzien van de complexiteit van biologische processen hier wellicht aan kunnen bijdragen. Maar uiteindelijk zullen cellulaire effecten, gemeten met aan *biomarkers* gerelateerde parameters, nodig zijn om de vertaling naar het hele organisme (mens of dier) te kunnen maken. Humane *in vitro* modellen, maar ook goede diermodellen die gebaseerd zijn op deugdelijke kennis van de vergelijkende fysiologische dierkunde, zullen hierbij van groot nut zijn.

Het testen van *biologicals* vraagt extra creativiteit van slimme onderzoekers: immers hoe test je de veiligheid van medicijnen die heel erg specifiek voor de mens gemaakt zijn voordat ze in de mens gebracht worden? (zie hoofdstuk 4, TGN1412 voorbeeld).

Al met al zijn er in de farmaceutische wereld interessante innovaties gaande om te komen tot een slimmere product-ontwikkeling en tot een oplossing van het pijlpijnprobleem. Op basis van de opkomst van translationeel onderzoek en *personalized medicines* wordt ook steeds meer nagedacht over de aanpassing van het ontwikkelingstraject als zodanig. Roses²⁷ beschrijft een mogelijkheid waarbij persoonsgerichte medicijnen sneller op de markt toegelaten worden en waarbij

veel meer nadruk ligt op de postmarketing risk management. Farmaco-epidemiologie, farmacogenetica en goede diagnostiek (*biomarkers*) spelen hierbij een cruciale rol. Deze benadering zou niet alleen bijdragen aan het meer (individu-)gericht voorschrijven van medicijnen, maar ook aan het voorkomen van ongewenste medicijnreacties. In deze benadering zijn *risk assessment* en *efficacy assessment* direct aan elkaar gekoppeld, op het niveau van het individu. De combinatie van epidemiologie, genetica en biomarkers is een fantastische ontwikkeling die ook bij werkplek-gerelateerd *risk assessment* onderzoek, zoals bij het IRAS, in opkomst is.

Nu nog zijn de innovaties erg duur, maar langzaamaan zullen de nieuwe technieken meer gemeengoed worden en de investeringskosten weer afnemen. En dat is ook goed voor de patiënten.

De goede lezer zal opgemerkt hebben dat communicatie tussen onderzoekers uit het vakgebied van de toxicologie en uit die van de farmacologie een enorme bijdrage kan leveren aan de implementatie van innovatieve kennis in de beide vakgebieden. Het volgende hoofdstuk zal een aantal voorbeelden behandelen waarbij de bijdragen van beide vakgebieden tot hun recht komen.

“ONVERWACHTE BEVINDINGEN DRAGEN BIJ AAN HET VASTSTELLEN VAN RISICO'S EN WERKING VAN STOFFEN”

pag
33

hoofdstuk 4
Over oude grenzen en
nieuwe bruggen in risk
assessment

lectoraat
Innovative Testing
in Life Sciences &
Chemistry

onderwerp
Grenzen verleggen &
bruggen bouwen

4 / OVER OUDE GRENZEN EN NIEUWE BRUGGEN IN RISK ASSESSMENT

In dit hoofdstuk worden drie voorbeelden behandeld, die illustratief zijn voor de beperkingen (grenzen) en mogelijkheden (bruggen) bij het vaststellen van werking en veiligheid van stoffen. De voorbeelden geven eens te meer aan dat de grens tussen farmacologie en toxicologie in de biologische werkelijkheid eigenlijk niet bestaat. Het eerste voorbeeld heeft te maken met ongewenste immunologische bijwerkingen van medicijnen en geeft aan dat “*personalized medicines*” ook toepasbaar bij het bepalen van veiligheid. Het tweede voorbeeld komt uit de wereld van de *biologicals* en is inmiddels een klassieke casus, die de beperkingen van dierproeven voor deze nieuwe medicijnen illustreert. Tot slot wordt een voorbeeld gepresenteerd dat aangeeft dat het tot in detail bestuderen van een toxisch effect kan leiden tot nieuwe therapeutische mogelijkheden.

4.1 Medicijnovergevoeligheid en een brug tussen vaststellen van werking en veiligheid.

Soms veroorzaken medicijnen een allergische reactie³⁰. De reactie kan variëren van relatief onschuldig, zoals pukkeltjes op de huid, tot zeer ernstig, zoals leverontstekingen. De meest dramatische effecten zijn (anafylactische) shock-reacties en aandoeningen die bekend zijn als “*Toxic Epidermal Necrolysis (TEN)*” en “*Stevens-Johnson Syndrome (SJS)*”. Net als andere vormen van allergie is medicijnallergie het resultaat van een normale immunologische reactie die optreedt tegen stoffen waartegen een immunologische reactie volstrekt onnodig is. Per medicijn is de kans dat allergie optreedt gelukkig laag. Voor het anti-epileptische medicijn carbamazepine ligt de kans tussen 1 en 10 op 10.000 patiënten. Maar het kan optreden bij ongeveer elk medicijn, vandaar dat medicijnallergie wel verantwoordelijk is voor 10 to 30% van alle ongewenste op medicijnen. Medicijnallergie is al vaak aanleiding geweest voor het terugnemen van een geaccepteerd medicijn

van de markt, en is ook een van de effecten die verantwoordelijk is voor de hoge *attrition rate*. De onkosten voor de farmaceutische industrie als gevolg van medicijnallergie kunnen hoog oplopen, al is onbekend hoe hoog. De directe kosten die gemoeid zijn met alle ongewenste medicijnreacties bij elkaar zijn beter bekend, en in Europa geschat op ongeveer €79 miljard per jaar (directe kosten). De indirecte kosten worden geschat op ongeveer €145 miljard per jaar³¹. Reden genoeg dus om het risico op het optreden van medicijnallergie (immers 10-30% van alle ongewenste medicijneffecten) te verkleinen.

Het grote probleem bij medicijnallergie is echter dat er geen preklinische testen zijn en dat de bijwerkingen pas zichtbaar worden als grote groepen mensen het medicijn gaan gebruiken. Dus wanneer het medicijn al op de markt is. Dit heeft ermee te maken dat het optreden van medicijnallergie afhankelijk is van individuele risicofactoren. Een deel van deze risicofactoren zijn van genetische aard, maar ook omgevingsfactoren, zoals sommige microbiële infecties, kunnen een risico vormen. De bekendste omgevingsfactor is wel een virale infectie. Virussen zoals HIV, herpes en hepatitis kunnen mensen gevoeliger maken voor het ontwikkelen van medicijnallergie. Zo hebben HIV patiënten volgens epidemiologen een 10 tot 100 keer hogere kans op ernstige huidreacties ten gevolge van medicijngebruik dan gezonde mensen³².

De gedeeltelijke oplossing voor dit probleem is gebruik te maken van de farmacogenetica. Zo is de genetische gevoeligheid voor het ontwikkelen van medicijnallergie voor enkele medicijnen al vastgesteld. Voor carbamazepine, een medicijn tegen epilepsie, heeft men gevonden dat de SNP-variatie bekend als HLA-B*1502 patiënten extra gevoelig voor het optreden van TEN en SJS³⁰. Voor abacavir, een anti-HIV medicijn, gelden weer andere genetische SNP kenmerken die patiënten gevoelig maken, onder anderen HLA-B*5701³³. Deze voorbeelden geven aan dat het mogelijk is door het tijdig analyseren van genetische eigenschappen, patiënten te beschermen tegen ongewenste medicijneffecten.

Bovendien geven ze het belang aan van de Fase IV of *post-marketing* onderzoek.

De uitdaging die nog altijd blijft, is of de individuele gevoeligheid vertaald kan worden naar vroege laboratoriumtesten, zodat de mogelijkheid dat een bepaald medicijn allergie kan veroorzaken ook eerder onderkend kan worden. Roses²⁷ stelt in zijn aangepaste versie van het medicijnontwikkelingstraject ook voor dat voor bepaalde aandoeningen, met name gerelateerd aan metabolisme en immuunsysteem, preklinisch getest wordt. En aangezien er steeds meer bekend wordt over de moleculaire en cellulaire processen die betrokken zijn bij het ontstaan van medicijnallergie komt die mogelijkheid ook daadwerkelijk dichterbij. Binnen het TIPharma project "*Towards novel translational safety biomarkers for adverse drug toxicity*" wordt hier onderzoek naar gedaan. Dit project, onder leiding van Prof. N. Vermeulen van de VU in Amsterdam, berust op samenwerking tussen verschillende universitaire onderzoeksgroepen, waaronder mijn onderzoeksgroep bij het IRAS, en verschillende farmaceutische en biotechnologische bedrijven. Het doel is te komen tot een translationele teststrategie die het mogelijk maakt het risico van ongewenste medicijneffecten, waaronder levertoxiciteit en medicijnallergie, te voorspellen op basis van een combinatie van stoffeïenschappen, cellulaire en moleculaire *in vitro* en *in vivo* effecten, en patiëntgegevens.

4.2 *Biologicals*: grenzen aan het testen van veiligheid met proefdieren

Oorspronkelijk was de gedachte dat *biologicals* door hun specifieke werking weinig bijwerkingen zouden hebben. Maar ze zijn natuurlijk wel biologisch actief en beïnvloeden dus ook allerlei processen. Sommige *biologicals* vertonen dan ook bijwerkingen, vaak met een immunologische oorsprong, die in ernst niet onderdoen voor klassieke niet-biologische geneesmiddelen.

Om terug te komen op mijn eerdere vraag: Hoe moeten *biologicals* die vaak speciaal voor toepassing in de mens gemaakt zijn op veilig-

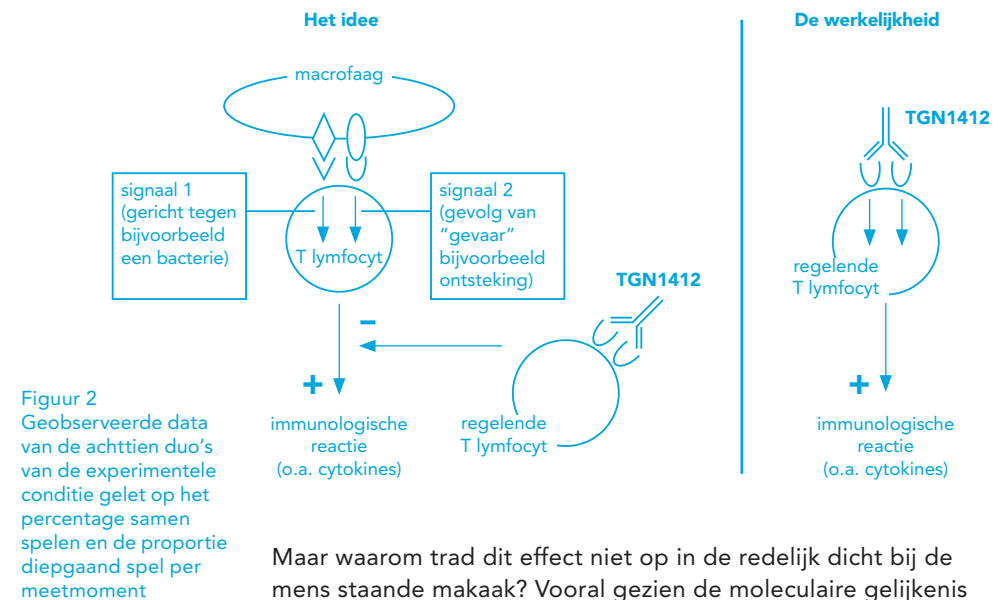
heid getest worden? Daar is in veel gevallen nog geen oplossing voor. Wel zijn er duidelijke ontwikkelingen gaande waarbij men zich richt op *in silico* (computer) mogelijkheden en op humane *in vitro* testen³⁴.

Een, nu al klassieke, casus die de beperking van proefdieronderzoek met *biologicals* aantoont is een vrijwilligersstudie gedaan in 2006 in een ziekenhuis in Londen met de stof TGN1412³⁵. TGN1412 is een monoklonaal antilichaam gericht tegen een membraaneiwit op T-lymfocyten, CD28. TGN1412 werd door een klein Duits biotechnologisch bedrijf, TeGenero, op basis van studies in muizen en ratten voorgesteld als een medicijn om bepaalde chronische ontstekingsziekten zoals reumatoïde artritis te genezen. Veiligheidstudies, inclusief een studie met Cynomolgus apen (*Macaca fascicularis*), waren dusdanig dat een studie met 6 gezonde vrijwilligers goedgekeurd werd. De studie met de vrijwilligers verliep echter dramatisch: tussen 1 en 4 uur na toediening van TGN1412 ontwikkelden alle vrijwilligers een syndroom dat in het Engels "*Fatal Organ Syndrome*" genoemd wordt, en dat veel lijkt op een algehele allergische reactie. Symptomen waren roodvorming van de huid (erythema), vaatverwijding, bloeddrukdaling, geheugenstoornissen, hartritme stoornissen, en koortsverschijnselen. Alle vrijwilligers ondergingen intensive care en pas na een aantal weken waren de vrijwilligers zodanig hersteld dat ze weer naar huis konden. Sommigen hebben echter blijvende effecten, zoals amputatie van afgestorven vingers.

Vanzelfsprekend waren onderzoekers en regelgevers in rep en roer. Aanvragen voor nieuwe humane studies werden "*on hold*" gezet, en er werden onderzoeken gestart om na te gaan wat er verkeerd was gegaan.

Duidelijk werd dat er bij de vrijwilligers een effect was opgetreden dat ook wel "*cytokine storm*" genoemd wordt. Zo'n "*cytokine storm*" zou het gevolg kunnen zijn van algehele directe activatie van alle T-lymfocyten (zie figuur 2). Cytokines bestaan in vele soorten en zijn van cruciaal belang in het afweersysteem omdat

ze zorgen voor activatie van immuuncellen. Sommige cytokines zijn bijvoorbeeld van belang voor het op gang brengen van een ontstekingsreactie, anderen dragen bij aan het ontstaan van koorts.



Maar waarom trad dit effect niet op in de redelijk dicht bij de mens staande muis? Vooral gezien de moleculaire gelijkenis van het betreffende molecuul in mens en muis. Uit wat nu blijkt hebben T-lymfocyten van de muis een moleculair mechanisme (bestaande uit zogenaamde *Siglec*-moleculen) dat de activiteit van de cellen remt maar dat in de mens ontbreekt^{36,37}. Waarschijnlijk daardoor traden de effecten zoals waargenomen in de vrijwilligers niet op in de apen. Bij nader inzien waren sommige effecten (afname van T-lymfocyten in het bloed) trouwens wel terug te vinden in proefdieren, maar zonder de dramatische gevolgen. Bovendien, *in vitro* assays met humane T-cellen die uitgevoerd waren om de effecten van TGN1412 te voorspellen, bleken achteraf toch niet op de juiste manier uitgevoerd³⁶. Samenvattend kan gesteld worden dat de TGN1412-casus heeft aangetoond dat voor het testen van de werking of veiligheid van monoklonale antilichamen apenstudies niet zonder meer voor de hand liggen,

maar dat het zinvoller lijkt daarvoor gebruik te maken van goed gevalideerde humane *in vitro* testen.

Wat dit drama ook nadrukkelijk aantoont, is dat grondige kennis ten aanzien van de fysiologie van verschillende diersoorten van uitermate groot belang is.

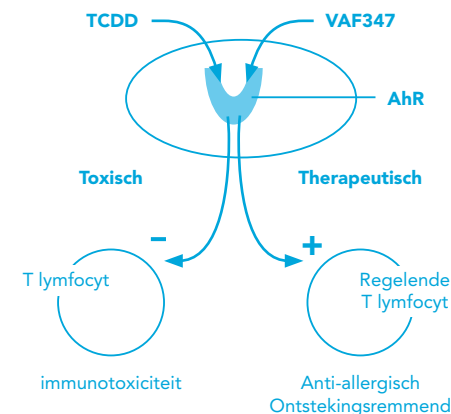
Als gevolg van het TGN1412 drama is ook een discussie ontstaan over de wijze waarop studies uitgevoerd moeten worden waarin voor het eerst stoffen in de mens getest worden: het zogenaamde "First-in-Man" studieprotocol^{38,39}. Een punt van discussie betrof het gebruik van NOAEL als basis voor veilige doses. Vooral de toevoeging "adverse" is hier een struikelblok: NOAEL gaat uit van *ongewenste* effecten. In het nieuwe "First-in-Man" studieprotocol wordt dan ook aangeraden uit te gaan van de "Minimal Anticipated Biological Effect Level (MABEL)". De MABEL is niet gebaseerd op *ongewenste* effecten maar op het *gewenste* biologische effect". Deze MABEL kan aanzienlijk lager zijn dan de NOAEL en is wellicht ook in algemene zin beter geschikt voor onderzoek met medicijnen.

4.3 De dioxine receptor: een brug tussen goed en kwaad

In de toxicologische leerboeken wordt de stof 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, beter bekend als TCDD of dioxine, wordt stevast vermeld als de meest toxische verbinding die door menselijk handelen geproduceerd is. In Casarett & Doull's Toxicology⁴⁰ staat een tabel waarin de 50% letale dosis (LD50, een dosis waarbij 50% van de blootgestelde dieren overlijdt) van TCDD (0.001 mg/kg lichaamsgewicht) vermeld staat tussen twee natuurlijke toxines: tetrodotoxin (LD50: 0.10 mg/kg) bekend van de Kogelvis en botuline toxine (LD50: 0.00001 mg/kg) dat geproduceerd wordt door de bacterie *Clostridium botulinum* (ook bekend van Botulisme maar ook van Botox). Ter vergelijking, de LD50 van strychnine is 2 mg/kg en van keukenzout 10.000 mg/kg. Het moet vermeld worden dat de LD50 van TCDD sterk varieert per diersoort: een cavia is 400 maal gevoeliger dan een muis.

TCDD is een van de vele dioxines, maar wel de meest potente. Dioxines worden gevormd bij productie van organische chloorverbindingen, bij verbranding van bijvoorbeeld PVC, maar komen ook vrij bij natuurlijke branden en vulkaanuitbarstingen. TCDD is ook bekend van een aantal incidenten. TCDD werd bijvoorbeeld aangetroffen als vervuiling in het herbicide "Agent Orange", dat al ontbladeringsmiddel gebruikt werd in Vietnam. TCDD is ook bekend van Seveso in Italië (1976), van de Vogelmeerpolder bij Amsterdam (jaren 80) en in 2004 ook in het nieuws geweest in relatie tot de poging tot vergiftiging van de Oekraïense politicus Viktor Yushenko. De meest recente TCDD-crisis, gesignaleerd eind 2008, betreft de vervuiling van lers varkens- en rundvlees met 80 tot 400 keer de EU-norm aan TCDD en TCDD-achtige stoffen (de "Irish pork crisis"). De gevolgen van dioxine blootstelling voor de gezondheid van de mens kunnen bij hoge blootstelling zeer ernstig zijn. TCDD kan de kans op tumorontwikkeling vergroten, en immunologische, neurologische effecten en geboorte-effecten veroorzaken.

Figuur 3
Geobserveerde data
van de achttien duo's
van de experimentele
conditie gelet op het
percentage samen
spelen en de proportie
diepgaand spel per
meetmoment



TCDD is vanwege zijn ernstige toxische werking mogelijk ook een van de meest onderzochte toxines. Dit heeft er toe geleid dat het moleculaire mechanisme TCDD intussen goed bekend is. Sinds midden jaren 70 is de receptor voor TCDD ook bekend: de *aryl*

hydrocarbon receptor (AhR). De receptor zorgt onder andere voor het in gang zetten van metabolisme.

Opmerkelijk is dat recentelijk aangetoond is dat de AhR een mogelijke target is voor therapieën. Zo bleek TCDD in staat te zijn de klinische symptomen ten gevolge van (Type 1) diabetes (Dr. N. Kerkvliet, Oregon State University, VS, persoonlijke communicatie), *autoimmune encephalomyelitis* (een proefdier-vorm van multiple sclerosis)^{41,42} en voedselallergie in proefdieren (Drs. Veronica Schulz, Dr. Joost Smit, eigen onderzoek) te verminderen. Dit gebeurt mogelijk doordat TCDD, via de AhR, de werking van bepaalde regelende T lymfocyten (zgn. CD25+ T regs) stimuleert⁴³ (zie figuur 3). In de laatste jaren is ook steeds duidelijker geworden dat de AhR niet erg kieskeurig is: tal van andere moleculen binden aan de receptor en kunnen min of meer dezelfde genen activeren^{44,45} en kunnen heel verschillende effecten hebben. Een bekend voorbeeld is de stof indole 3-carbinol die aanwezig is in groenten zoals boerenkool, spruitjes en broccoli. Intussen zijn onderzoekers druk op zoek naar nieuwe liganden voor de AhR receptor om zo mogelijke therapeutische moleculen te identificeren. Zo hebben onderzoekers in de VS (Kerkvliet en collega's) het plan opgevat om een verzameling van wel 50.000 stoffen los te laten op cellen die als gevolg van AhR binding een fluorescerend signaal afgeven, zodat activiteit van de receptor direct gemeten kan worden. Onafhankelijk van dit onderzoek is er begin 2008 een studie verschenen die het remmende effect beschrijft van een AhR-bindend stofje (VAF347, geproduceerd voor Novartis) op allergische longontsteking⁴⁶.

Het voorbeeld met TCDD toont aan dat de grens tussen de werking en de veiligheid van een stof veel minder scherp is dan soms gedacht wordt. Het geeft ook aan dat het ook voor medicijnontwikkeling goed is een toxicologisch mechanisme grondig te onderzoeken.

“LECTORATEN IN LIFE SCIENCES & CHEMISTRY VERVULLEN EEN ROL BIJ DE VERTALING VAN KENNIS IN KUNDE”

pag
43

hoofdstuk 5
Innovative testing
aan de hogeschool:
Lectoraten met een
brugfunctie

lectoraat
Innovative Testing
in Life Sciences &
Chemistry

onderwerp
Innovative Testing
Grenzen verleggen &
bruggen bouwen

5 / INNOVATIVE TESTING AAN DE HOGESCHOOL: LECTORATEN MET EEN BRUGFUNCTIE.

In dit hoofdstuk zal ik ingaan op de rol die een lectoraat *Innovative testing in Life Sciences & Chemistry* aan de hogeschool kan betekenen voor het thema *innovative testing*. Daarbij is het goed om te benadrukken dat ik naast mijn lectoraat aan de HU, ook nog werkzaam ben bij de Universiteit Utrecht als immunotoxicoloog bij het IRAS. Ik ben sinds halverwege 2008 ook werkzaam voor Hogeschool Utrecht en begin nu ook steeds meer bekend te raken met het reilen en zeilen op hogescholen.

Van oudsher is de rol van het Hoger Beroeps Onderwijs (HBO) in *Life Sciences & Chemistry* het opleiden van analisten. De rol van de universiteiten is klassiek gezien veel meer tweeërlei: het doen van fundamenteel onderzoek en het opleiden van mensen tot wetenschappelijke onderzoeker. Dat verschil in focus zal nog wel blijven bestaan, maar er lijkt een opmerkelijke verschuiving op te treden, zeker op het gebied van *Life Sciences & Chemistry*. De universiteiten schuiven steeds meer op richting toegepast onderzoek, terwijl sinds een aantal jaren de hogescholen steeds meer onderzoek naar zich toe trekken, eveneens toegepast onderzoek.

Aan de universiteit is al een aantal jaren een verandering ingezet in de aard van het onderwijs. Mede door de hoge kosten die gepaard gaan met praktijkonderwijs wordt er steeds meer zogenaamd probleemgestuurd onderwijs (PGO) gegeven. Dat komt er op neer dat de studenten een probleem voorgelegd krijgen waarvoor ze de oplossing moeten opzoeken in de verschillende databases in bibliotheken en natuurlijk op internet. Deze onderwijsvorm heeft voor- en nadelen. Het goede van PGO is dat studenten leren om een probleem te analyseren en conceptualiseren. Het nadeel is dat studenten aan de universiteit pas in een later stadium, tijdens de zogenaamde master-fase, in aanraking komen met praktijkonderwijs en dus pas later in hun opleiding leren hoe

ze hun analyse of concept naar de praktijk kunnen vertalen. De door de politiek, bestuurders en werkgevers gewenste vertaling van kennis in maatschappelijke toepassingen kan hierdoor in het gedrang komen. Onderwijs aan de universiteiten loont niet meer. Onderzoekers aan de universiteit worden immers steeds meer afgerekend op hun onderzoek. In Bionieuws van 24 januari 2009 is dat als volgt te lezen: "Op de universiteiten wordt het geven van onderwijs niet beloond, maar afgestraft". Bij het departement Biologie van de Bètafaculteit van de Universiteit Utrecht heeft dat begin dit jaar geleid tot het opheffen van alle dierkunde-gerelateerde vakgroepen.

Volgens het rapport "Passie en Precisie-Over de veranderende functie van de hogescholen" uit 2007 (47) geschreven door onder anderen collega lector Frans Leijnse hebben de hogescholen een opmerkelijke vernieuwing doorgemaakt. Een van de vernieuwingen is om studenten, meer dan voorheen, te confronteren met de professionele beroepspraktijk in de vorm van stages en praktijkopdrachten. Daarmee wordt een onderzoekende houding gestimuleerd. Natuurlijk zal het praktijkonderwijs de volledige aandacht behouden, zeker op het terrein van *Life Sciences & Chemistry*, maar het leren omgaan met en uitvoeren van onderzoeksopdrachten zal bijdragen aan een conceptuele kennis, iets wat voorheen meer voorbehouden was aan universiteiten.

Gaandeweg lijkt de grens tussen universiteiten en hogescholen dus steeds vager te worden. Vooral binnen de hogescholen heeft dat al tot vele discussies geleid, zoals tijdens workshops bij de start van het studiejaar 2008/2009. Die discussies lijken wel iets weg te hebben van een identiteitscrisis, maar maken ook duidelijk dat de hogescholen ook echt met een innovatieslag bezig zijn. De discussie draait bijvoorbeeld om de vraag of de hogescholen in huis onderzoek moeten doen. Ik denk dat dat heel goed is, om ervoor te zorgen dat hogeschool afgestudeerden nog beter voorbereid zijn op het bijdragen aan kennisontwikkeling. In deze context wil ik weer graag verwijzen naar het rapport "Passie en Precisie", om hier niet in te hoeven gaan op het relatieve verschil

tussen fundamenteel en toegepast onderzoek. Ik denk dat mijn les heeft laten zien dat fundamenteel en toegepast onderzoek op het terrein van "Innovative testing" hand in hand gaan. Nog sterker, vakken zoals toxicologie en farmacologie zijn overwegend toepassingsgericht.

De laatste jaren neigt het onderzoek in Nederland meer en meer naar een zekere toepassingsgerichtheid. Dit heeft waarschijnlijk veel te maken met hoe de typisch Nederlandse ondernemersgeest reageert in een tijd waarin het gewoonweg moeilijk is fundamenteel onderzoek gefinancierd te krijgen. Door het uitvoeren van toepassingsgericht onderzoek streven de universiteiten naar meer betrokkenheid van het kapitaalcrachtige bedrijfsleven bij het universitaire onderzoek en onderwijs. Zeker op het gebied van *Life Sciences & Chemistry* is er al jarenlang een grote behoefte aan goed opgeleide professionals^{48,49,50}. Sommige farmaceutische bedrijven hebben zelfs speciale fondsen in het leven geroepen om de goede studenten (aan hogescholen en universiteiten worden ze honours genoemd) te stimuleren. Nederlandse initiatieven om onderzoek en onderwijs op het gebied van toegepaste wetenschappen te stimuleren zijn topinstituten zoals het eerder genoemde TIPharma. Hogescholen zouden bij deze ontwikkelingen beter betrokken moeten worden, vooral omdat de behoefte aan uitvoerende professionals zo groot is.

Minister Plasterk van OCW gaat in zijn strategische agenda uit 2007 ook duidelijk in op het belang van de opleiding van toepassingsgerichte professionals⁵¹. In de openingszin van zijn agenda geeft hij in algemene zin aan dat vooruitgang vooral te danken is aan resultaten van wetenschappelijk doorbraken en innovatieve bedrijvigheid, in de praktijk gebracht door mensen die op hoog niveau functioneren. Hij schrijft verder: "HBO-instellingen kunnen met onderzoeksactiviteiten op het gebied van ontwerp en ontwikkeling een belangrijke rol spelen bij het vergroten van het innovatieve vermogen van het midden- en kleinbedrijf." De minister noemt nog veel meer interessante punten, maar een daarvan is vooral relevant voor mijn betoog: "Verbindingen tussen opleidingen en

werkgevers moeten versterkt worden.” En “Dit zal leiden tot beter en leuker onderwijs en zorgt voor *kennistoepassing en innovatie*”. En nog iets verder in de agenda wordt vermeld: “De relaties tussen kennisinstituten en de beroepspraktijk moeten worden geïntensiveerd”. En tot slot “Hogescholen en lectoren spelen in dit proces een belangrijke rol”.

Goed om te lezen en koren op mijn molen. Ik ben het met de minister eens dat kennisinstellingen als de universiteiten, maar ook instituten als TNO en RIVM veel nadrukkelijker moeten samenwerken met HBO-instellingen. En niet alleen op onderwijsgebied, wat al gebeurt, maar nadrukkelijk ook op onderzoekgebied. We moeten af van het idee dat HBO-instellingen minder zijn dan universiteiten, ze zijn wel anders, maar dat is ook juist de bedoeling. Alleen dan kunnen ze complementair zijn en kunnen ze uiteindelijk meer naar elkaar toe groeien. En bovendien ben ik van mening dat hogescholen en universiteiten elkaar ook echt nodig hebben: voor het uitwisselen van kennis en kunde en voor het vertalen van kennis in kunde. Ik wil dan ook werken aan een betere samenwerking tussen het Kenniscentrum van de HU en de verschillende onderzoeksgroepen aan de UU, in eerste instantie het IRAS, maar nadrukkelijk ook andere onderzoeksgroepen bij de Bètafaculteit, Faculteit Diergeneeskunde en het UMCU. Ik denk dat dit ook goed zal lukken omdat in mijn optiek de grenzen vager zijn dan wel eens gedacht wordt. En daar waar er grenzen zijn, kunnen altijd bruggen gebouwd worden.

Wat kan het Kenniscentrum Life Sciences & Chemistry van de HU nu daadwerkelijk bijdragen aan *innovative testing* van stoffen? Om dat vast te stellen is het goed voor ogen te houden dat de hogeschool primair een onderwijsstaak heeft, meer dan de universiteit. Ook is het goed voor ogen te houden dat het onderzoek aan de hogeschool in eerste instantie gericht is op de praktijk, toepassingsgericht dus. Het doel van het Kenniscentrum Life Sciences & Chemistry, waar mijn collega-lector Cyrille Krul en ikzelf samen met collega's binnen het Institute

for Life Sciences & Chemistry werkzaam zijn, is om de rol van kennispoort te vervullen: we willen een bijdrage leveren aan het oplossen van vragen uit de praktijk van het bedrijfsleven, vooral het MKB. Daarvoor moeten onderzoeksopdrachten goed gedefinieerd en professioneel uitgevoerd worden.

Qua onderzoeksvraag zal het Kenniscentrum Life Sciences & Chemistry zich richten op het ontwikkelen, valideren en implementeren van slimme teststrategieën om de veiligheid en werking van stoffen vast te stellen om zo een bijdrage te leveren aan het werkveld van *innovative testing*. Het Kenniscentrum wil dat nadrukkelijk doen in samenwerking met de kennisinstellingen in de regio, maar ook in de rest van Nederland en het buitenland. Door de opdrachten samen met studenten en docenten te doen, zal het Kenniscentrum bijdragen aan de opleiding en/of professionalisering van praktijkgerichte onderzoekers en daarmee aan het slechten van vage grenzen en bouwen van noodzakelijke bruggen.

Onderzoek doen op het HBO is pionieren. Pionieren is fantastisch, maar dat kun je toch het best doen op de bok van een goed gevulde huifkar. Mijn collega lector Cyrille Krul en ik willen dat daarom in eerste instantie doen op onderzoeksgebieden waar we door onze achtergrond al verstand van hebben en die bovendien van groot belang geacht worden voor de veiligheid en werking van stoffen: ontstekingsaandoeningen (immunotoxicologie/ immunofarmacologie) en kanker (genetische toxicologie). Gelukkig hebben we daarbij de steun van de medewerkers van het Kenniscentrum: Marc Teunis, Johanna Louter, Saertje Verkoeijen, Robert Jan Veldman, Rende Nawrocki en Tineke Malherne-Dupont. Maar we willen dat ook doen met onze collega's van TNO en IRAS.

Vanuit het Kenniscentrum is een project in voorbereiding dat we willen indienen in het kader van een RAAK-PRO aanvraag. RAAK staat voor Regionale Aandacht en Actie voor Kenniscirculatie en is bedoeld om de nieuwe rol van de HBO te stimuleren. We willen in dat project samenwerken met andere

hogescholen, kennisinstellingen (TNO, WUR, en UU-IRAS-Faculteit Diergeneeskunde en Bètafaculteit) en geïnteresseerde bedrijven aan een strategie om de werking en toxiciteit van natuurlijke stoffen vast te stellen. Het gekozen thema biedt interessante aanknopingspunten voor zowel de chemie als de life sciences studenten en docenten en heeft ook een groeiende belangstelling van het Nederlandse bedrijfsleven.

De openbare les ging over bruggen en grenzen in “Innovative testing” in “Life Sciences & Chemistry”. Ik hoop dat ik duidelijk heb gemaakt wat daarmee bedoeld kan worden. Het zal ook duidelijk zijn dat onze ambitie hoog is, maar die heb je nodig om de uitdaging aan te gaan. We staan met het Kenniscentrum *Life Sciences & Chemistry* immers pas aan het begin.

Utrecht, 29 januari 2009

BIJLAGEN

DANKWOORD	51
CURRICULUM VITAE	53
REFERENTIELIJST	54

pag
51

bijlage
Dankwoord:

/ DANKWOORD

Dames en heren, rest mij een paar woorden van dank.

Op de eerste plaats wil ik het college van bestuur van Hogeschool Utrecht en de directie van de Faculteit Natuur & Techniek bedanken voor het vertrouwen dat zij in mij hebben uitgesproken om het lectoraat Innovative testing in Life Sciences & Chemistry verder gestalte te geven.

Op de tweede plaats wil ik de directie van het IRAS bedanken omdat ze mij de gelegenheid geven voor een periode van 4 jaar een deel van mijn tijd te besteden aan de werkzaamheden aan de hogeschool. Ik ga mijn uiterste best doen om ervoor te zorgen dat het niet alleen voor mezelf de moeite waard is.

Ik wil ook de mensen bedanken die in mijn onderzoeksgroep bij het IRAS doorgaan met hun werk alsof ik er gewoon ben. Het gaat om de analisten Marianne Bol-Schoenmakers, Rob Bleumink, Daniëlle Fiechter en Ine Hassing, de postdocs Irene Ludwig en Joost Smit, en de AiO's Lydia Kwast, Marisa Marcondes Rezende, Veronica Schulz en Maaïke Steenhof. Hun inzet getuigt van grote verantwoordelijkheid, zelfstandigheid en enthousiasme voor het eigen werk, en maakt het voor mij een stuk makkelijker het lectoraat goed uit te voeren. Het is altijd een groot plezier om bij het IRAS te zijn.

Mijn nieuwe collega's bij de hogeschool wil ik bedanken voor hun warme welkom, hun geweldige inzet en vooral hun enthousiasme om er iets van te maken. Vooral de mensen waar ik direct mee te maken heb wil ik noemen: Johanna Louter, Saertje Verkoeijen, Robert-Jan Veldman, Renate Nawrocki, Tineke Malherbe-Dupont, Nathalie Bovy en Geert Schoenmakers. Zoals gezegd met zulke collega's is het pionieren niet moeilijk, maar juist een uitdaging. Mijn streven is de beide groepen waarbij ik de komende jaren betrokken ben dicht bij elkaar te brengen om goed onderzoek te doen en daarbij een bijdrage te leveren aan de opleiding van hogeschoolstudenten.

Ik wil twee mensen van de HU apart noemen: Marc Teunis, coördinator van het Kenniscentrum en mijn collega lector Cyrille Krul. Ik heb begrepen dat zonder Marc dit Kenniscentrum er niet zou zijn. Ik merk elke dag dat hij er helemaal voor gaat. Enthousiasme en kennis in combinatie met grote inzet. Een echte pionier met het hart en het brein op de juiste plek.

Nadat ik de advertentie voor het lectoraat gelezen had en na gebeld te hebben met Annemarie Slootweg heb ik bij Cyrille meer directe informatie ingewonnen. Haar eerlijkheid sprak mij meteen aan: ik moest vooral niet teveel verwachten en me realiseren dat het echt pionieren is. Die eerlijkheid heeft ertoe bijgedragen dat ik niet erg lang getwijfeld heb. Haar niet aflatende enthousiasme en opgewektheid zijn een steun in de rug. Bovendien is Cyrille iemand waarmee het goed sparren is. Het gaat ons zeker lukken.

Er is gelukkig ook nog een leven naast de UU en de HU. Ik kan dit werk onmogelijk doen zonder regelmatige, liefst wekelijkse ontsnapping- en ontspanningsmogelijkheden. Daarbij zijn vrienden en vriendinnen erg belangrijk. Zonder namen te noemen, dank jullie wel!

Tot slot wil ik mijn dames thuis bedanken voor hun steun: Yvonne, Niké, Evie en Veerle. Jullie helpen me, met al jullie liefde, het onderzoek en onderwijs bij de HU en de UU, te relativieren tot hun juiste proporties. Heerlijk.

/ CURRICULUM VITAE

Raymond Pieters (1962) studeerde Biologie aan de Universiteit van Groningen en aan de Universiteit Utrecht. Hij specialiseerde zich in de Toxicologie en Immunologie en is gepromoveerd op een proefschrift over de effecten van organotin verbindingen op het immuunsysteem. Daarna werd hij universitair docent en later universitair hoofddocent bij het Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS) van de Universiteit Utrecht. Sinds geruime tijd is hij daar hoofd van de onderzoeksgroep Immunotoxicologie. De Immunotoxicologie groep bij het IRAS heeft zich gespecialiseerd in onderzoek naar allergene effecten van stoffen uit medicijnen, de voeding en het milieu. Hij is als copromotor betrokken (geweest) bij 14 promoties en (mede-)auteur van 80 publicaties in wetenschappelijke tijdschriften en boeken. In zijn hoedanigheid als immunotoxicoloog is hij als adviseur actief (geweest) in verschillende nationale (Gezondheidsraad) en internationale organisaties (WHO, ECVAM, ILSI en ICCVAM). Sinds medio 2008 is hij deeltijd lector Innovative Testing binnen het Kenniscentrum Life Sciences & Chemistry van Hogeschool Utrecht.

/ REFERENTIELIJST

Hoofdstuk 2

- ¹ Nationaal Kompas:
http://www.rivm.nl/vtv/object_document/o4237n16906.html
- ² Kaplan W, Laing R (2004) Priority medicines for Europe and the World. World Health Organization, Department of Essential Drugs and Medicines Policy. Geneva. Sw.
- ³ FDA (2007) <http://www.fda.gov>, voor "Drug Safety Documents".
- ⁴ Danhof M, de Lange ECM, Della Pasqua OE, Ploeger BA, Voskuyl RA (2008) Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modelling in translational drug research. *Trends Pharmacol Sc.* 29, 186-191.
- ⁵ Muster W, Breidenbach A, Fischer H, Kirchner S, Muller L, Pahler A (2008) Computational toxicology in drug development. *Drug Discovery Today* 13, 303-310.
- ⁶ Ekins S, Nikolsky Y, Nikolskaya T (2005) Techniques: Application of systems biology to absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity. *Trends Pharmacol Sc.* 26, 202-209.
- ⁷ Ahlers J, Stock F, Werschkun B (2008). Integrated testing and intelligent assessment-new challenges under REACH. *Environm Sci Pollut Res Int.* 15, 565-572.
- ⁸ Harrill AH, Rusyn IR (2008) Systems biology and functional genomics approaches for the identification of cellular responses to drug toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4, 1379-1389.
- ⁹ Zhang L, Mu X, Fu J, Zhou Z (2007) In vitro cytotoxicity assay with selected chemicals using human cells to predict target-organ toxicity of liver and kidney. *Toxicol in vitro* 21, 734-740.
- ¹⁰ Blaauboer, BJ (2008) The contribution of in vitro toxicity data in hazard and risk assessment: Current limitations and future perspectives. *Toxicol. Lett.* 180, 81-84.
- ¹¹ Slater T, Bouton C, Huang ES (2008) Beyond data integration. *Drug Discovery Today* 13, 584-588.

Hoofdstuk 3

- ¹² Drug Discovery and Development. Technology in transition, ed HP Rang, Elsevier Ltd 2006.
- ¹³ DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG (2003) The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 22, 151-158.
- ¹⁴ Willmann JK, Van Bruggen N, Dinkelberg LM, Gambhir SS (2008) Molecular imaging in drug development. *Nature Rev. Drug Discovery* 7, 591-607.
- ¹⁵ Anonomous (2006) New Drug Development. Science, Business, Regulatory, and Intellectual Property Issues Cited as Hampering Drug Development Efforts. United States Government Acvounatbility Office (GAO).
- ¹⁶ Kola I, Landis J (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates. *Nature Rev. Drug Discovery.* 3, 711-715.
- ¹⁷ Dean JH, Hincks JR, Remandet B (1998) Immunotoxicology assessment in the pharmaceutical industry. *Tox Lett* 102-103, 247-255.
- ¹⁸ Bembenek SD, Tounge BA, Reynolds CH (2008) Ligand efficiency and fragment-based drug discovery. *Drug Discovery Today* epub.
- ¹⁹ Van Ree J, Breimer DD (2008) Pharmacology in The Netherlands: past, present and future. *Trends Pharmacol Sciences* 29, 167-169.
- ²⁰ Wang Y (2008) Needs for new plant-derived pharmaceuticals in the post-genome era: an industrial view in drug research and development. *Phytochem Rev* 7, 395-406.
- ²¹ Bindseil KU, Jakupovic J, Wolf D, Lavayre J, Leboul J, Van der Pyl D (2001) Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery. *DDT* 6, 840-847.
- ²² Lee SJ, Kanavaugh A (2005) Adverse reactions to biologic agents: Focus on autoimmune disease therapies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 900-905.
- ²³ Butcher EC (2005) Can cell systems biology rescue drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 461-467.
- ²⁴ Kubinyi H (2003) Drug research: myths, hype and reality. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 665-668.
- ²⁵ Lesko LJ (2007) Personalized medicine: Elusive dream of imminent reality? *Clin. Pharmacol & Therapeutics* 81, 807-816.
- ²⁶ Roses A (2007) "Personalized medicine: Elusive dream of imminent reality?" A commentary. *Clin. Pharmacol & Therapeutics* 81, 801-805.

- ²⁷ Roses AD (2008) Pharmacogenetics in drug discovery and development: a translational perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 807-817.
- ²⁸ Phillips KA, Van bebber S, Issa AM (2006) Diagnostics and biomarker development: priming the pipeline. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 463-469.
- ²⁹ Willman JK, Van Bruggen N, Dinkelborg LM, Gambhir SS (2008) Molecular imaging drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 591-607.

Hoofdstuk 4 Medicijnallergie

- ³⁰ Drug hypersensitivity. Ed W.J. Pichler, Karger AG, 2007
- ³¹ http://wijzijn.europamorgen.nl/9353000/1/j9vvhjakycuezg/vi0qi5jsrezq?ctx=vg9pl2emdcyl&start_tab0=20
- ³² Phillips E, Mallal S (2007) Drug hypersensitivity in HIV. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7, 324-330.
- ³³ Hughes AR et al. (2008) Pharmacogenetics of hypersensitivity to abacavir: from PGx hypothesis to confirmation to clinical utility. *Pharmacogenomics J.* 8, 365-374

Biologicals: TGN1412 casus

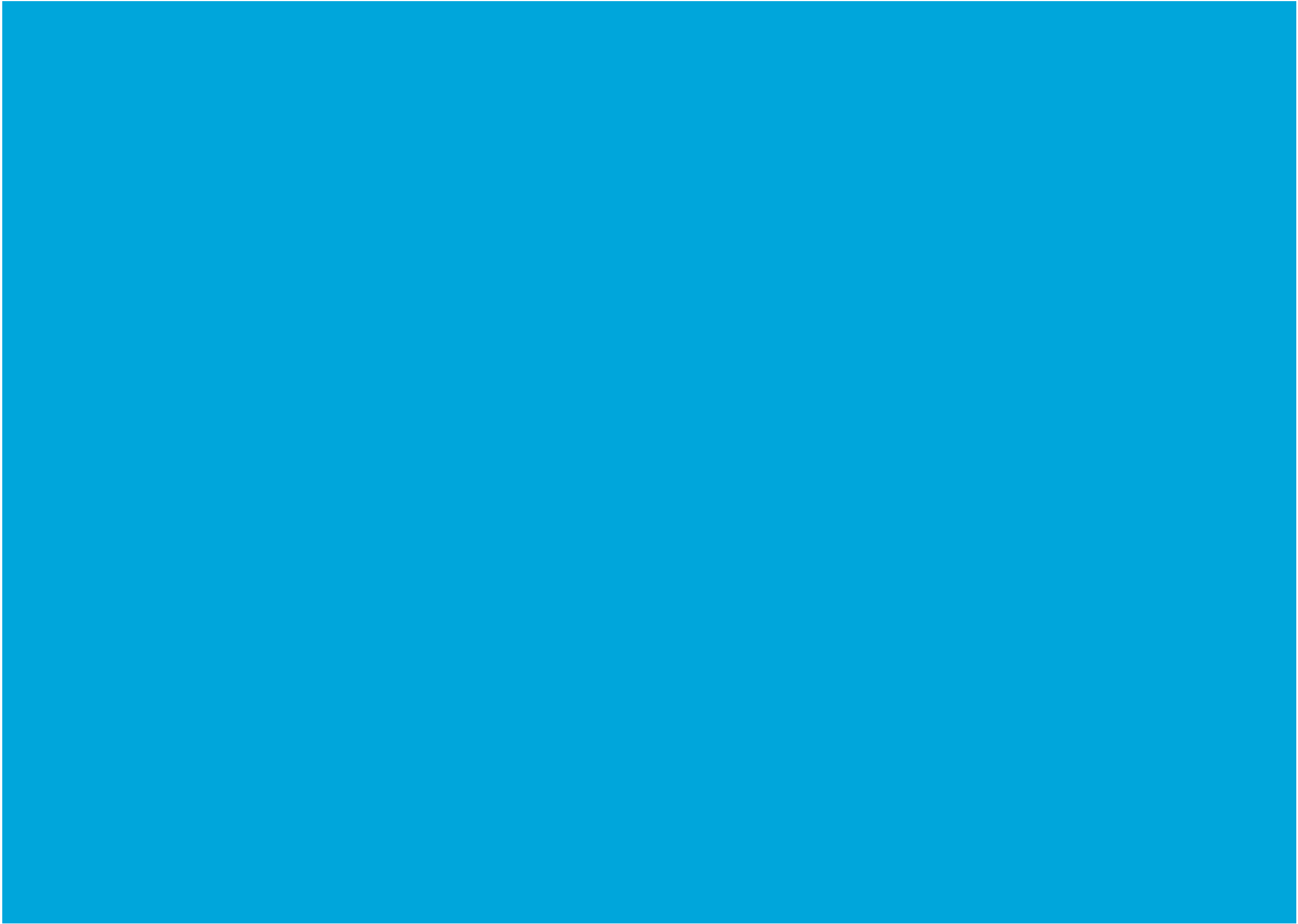
- ³⁴ Van Walle I, Gansemans Y, Parren PWHI, Stas P, Lasters I (2007) Immunogenicity screening in protein drug development. *Expert Opin. Biol. Ther.* 7, 405-418.
- ³⁵ Suntharalingham G, et al. (2006) Cytokine storm in a Phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Eng. J. Med.* 355, 1-11.
- ³⁶ Stebbings R, et al. (2007) "Cytokine storm" in the Phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: Better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J. Immunol.* 179, 3325-3331.
- ³⁷ Schraven B, Kalinke U (2008) CD28 agonists: What makes the difference in humans? *Immunity* 28, 591-595.
- ³⁸ EMEA-CHMP. 2007. Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products. Doc.Ref.EMEA/CHMP/SWP/294648/2007.
- ³⁹ Dayan CM, Wraith DC (2008) Preparing for the first-in-man studies: the challenges for translational immunology post-TGN1412. *Clin Exp Immunol* 151, 231-234.

Dioxine

- ⁴⁰ Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons. 6th edition. Ed CD Klaassen. McGraw-Hill, 2001, pg 13.
- ⁴¹ Quintana et al. (2008) Control of Treg and Th17 cell differentiations by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453, 65-71.
- ⁴² Veldhoen et al. (2008) The arylhydrocarbon receptor links Th17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453, 106-109.
- ⁴³ Funatake CJ, Marshall NB, Steppan LB, Mourich DV, Kerkvliet NI (2005) Cutting edge: Activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4+CD25+ cells with characteristics of regulatory T cells. *J. Immunol* 175, 4184-4188.
- ⁴⁴ Denison MS, Nagy SR (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 309-334.
- ⁴⁵ Zhang S, in C, Safe SH (2003) Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: Effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect* 111, 1877-1882.
- ⁴⁶ Lawrence BP et al (2008) Activation of the aryl hydrocarbon receptor is essential for mediating the anti-inflammatory effects of a novel low-molecular-weight compound. *Blood* 112, 1158-1165.

Hoofdstuk 5

- ⁴⁷ Frans Leijnse, Jacqueline Hulst, Loek Vroomans: Passie en precisie 1. Over de veranderde functie van hogescholen. Uitgave Hogeschool Utrecht 2007.
- ⁴⁸ Gibson A. (2002) A bridge between academia and the drugs discovery pipeline. *Nature Rev. Drug Discov* 1, 401.
- ⁴⁹ Editorial (2002) Fuelling the pipeline. *Nature Rev. Drug Discov* 1, 167.
- ⁵⁰ Vastag B (2008) Opportunities abound in Toxicology. <http://sciencecareers.sciencemag.org>.
- ⁵¹ Plasterk R. Strategische agenda voor het hoger onderwijs-, onderzoek- en wetenschapsbeleid. Ministerie OCW, 2007.



VEILIG EN VERANTWOORD VERNIEUWEN

"MENSEN VRAGEN OM VEILIGE PRODUCTEN, MAAR LIEVER ZONDER DIERPROEVEN"

1 / INLEIDING

Graag willen we allemaal in goede gezondheid oud worden, willen we lekker eten, er mooi uit zien en in een schone en veilige omgeving wonen. Kijk om je heen en je ziet dat we in Nederland al veel bereikt hebben! Toch kan en moet het nog beter: het denken over duurzaamheid staat nog in zijn kinderschoenen en er zijn nog veel ziekten die we nog niet kunnen genezen. Het onderwerp waar ik het met u over wil hebben is Veilig en Verantwoord Vernieuwen... zonder dierproeven.

Er is continu behoefte aan nieuwe producten. Daaraan stellen we hoge eisen qua veiligheid, of het nu gaat om medicijnen, ons voedsel, verzorgingsproducten of onze leef- en werkomgeving. Dat we bij de beoordeling van de veiligheid van nieuwe of bestaande producten vaak dierproeven gebruiken realiseren we ons meestal niet. In de media wordt vaak eenzijdig bericht, bij de veiligheid van ons voedsel (denk aan het melamine schandaal) wordt niet stilgestaan bij de vereiste dierproeven; aan de andere kant wordt veel aandacht besteed aan dierproeven uitgevoerd voor de veiligheidsbeoordeling van cosmetica. Aan de ene kant vragen we om nieuwe en veilige(re) producten, maar aan de andere kant vinden we dat we niet het recht hebben daarvoor dieren te gebruiken. Dat is in het kort het dilemma van waarvoor we staan.

Krantenkoppen maken ons duidelijk dat de roep om minder dierproeven groter is dan ooit. De komst van o.a. de Partij voor de Dieren in de Tweede Kamer geeft aan dat de maatschappelijke aandacht voor dit onderwerp prominent aanwezig is. Ook belangenorganisaties als Vereniging Proefdiervrij en de Dierenbescherming zien hun ledenaantallen stijgen. Daarnaast is er ook sprake van radicalisering. Iedereen herinnert zich het gewelddadige optreden van dieractivisten in Venray eind 2007. Intimidaties en brandstichtingen bij medewerkers van bedrijven die dierproeven uitvoeren, beperken zich niet langer tot Engeland.

Dit heeft er eind 2008 toe geleid dat Minister Ter Horst aankondigde de acties van dieractivisten een halt toe te willen roepen.

Innovative testing

In de openbare les van mijn collega lector Raymond Pieters, is het domein van het lectoraat '*Innovative Testing in Life Sciences & Chemistry*' toegelicht. Kort samengevat richt dit lectoraat zich op de ontwikkeling en toepassing van innovatieve teststrategieën om geneesmiddelen, voedingsmiddelen of chemicaliën (stoffen) te beoordelen op hun werkzaamheid (effectiviteit) en veiligheid. De nadruk ligt op de ontwikkeling van snelle, kosteneffectieve testmethoden die een relevante voorspelling van effecten op de gezondheid van de mens en het milieu opleveren én waarbij geen of minder proefdieren worden gebruikt.

Veilig en Verantwoord Vernieuwen

In mijn les zal ik u laten zien waar proefdieren voor gebruikt worden. Hierbij zal ik mij voornamelijk richten op de Nederlandse situatie. Ik zal ingaan op de wetenschappelijke en maatschappelijke wens om minder proefdieren te gebruiken en op de vraag wat we verstaan onder 'alternatieven voor dierproeven'. Daarna zal ik bespreken waarom er in Nederland en Europa recentelijk meer aandacht is voor dit onderwerp. Het overzicht zal niet uitputtend zijn, maar zal u een goede indruk geven van het landschap. Ook zal ik stil staan bij de vraag: Waarom zijn we tot nog toe zo weinig succesvol geweest op het gebied van alternatieven voor dierproeven? Wat zijn de obstakels en wat kunnen we hier van leren? Hoe zouden we in de praktijk de toepassing van alternatieven kunnen stimuleren? Wat moet er beter, en hoe gaan we dat doen? Als we slimmer willen testen moeten we de huidige grenzen verleggen, of beter over de grenzen van ons vakgebied heen kijken. Ik zal aangeven waar prioriteiten liggen en hoe we de meeste 'winst' kunnen behalen in termen van proefdierversmindering in relatie tot productinnovatie. Tot slot zal ik aangeven welke bruggen we moeten bouwen en wat de rol is van de Hogeschool Utrecht.

“PROEFDIEREN HEBBEN EEN BELANGRIJKE ROL GESPEELD IN DE MEDISCHE VOORUITGANG”

pag
67

hoofdstuk 2
Dierproeven een
‘noodzakelijk kwaad’?

lectoraat
Innovative Testing
in Life Sciences &
Chemistry

onderwerp
Innovative Testing
Grenzen verleggen &
bruggen bouwen

2 / DIERPROEVEN EEN ‘NOODZAKELIJK KWAAD’?

De laatste jaren is niet alleen de maatschappelijke en politieke aandacht voor alternatieven voor dierproeven toegenomen, maar ook binnen de wetenschappelijke wereld bestaat er al veel langer een zoektocht naar alternatieven voor dierproeven. Hoewel binnen de wetenschappelijke wereld proefdieronderzoek een belangrijke plaats in neemt, zien onderzoekers dierproeven als een noodzakelijk kwaad. Ze gebruiken liever geen dierproeven.



Rex Burch (links)
Bill Russel (rechts)

Een belangrijke mijlpaal was de verschijning van het boek ‘The principles of Humane Experimental Techniques’ van W.M.S. Russell & R.L. Burch in 1959, nu precies 50 jaar geleden¹. Bill Russell en Rex Burch introduceerden onder wetenschappers het concept van de zogenaamde 3Vs met als primaire doel betere, humane wetenschap te bedrijven. In het Engels is het concept bekend als de ‘3R principle’. De 3Vs staan voor elke methode die bijdraagt aan het Vervangen (*Replacement*) van dierexperimenten, het Verminderen (*Reduction*) van het aantal dierproeven en het Verfijnen (*Refinement*) van de dierproef door minder pijn en leed te veroorzaken. Vaak worden alternatieven gezien als methoden waarbij geen dieren worden gebruikt en worden dus gezien als vervanging van dierproeven. Maar onder deskundigen in dit veld wordt een bredere betekenis van de term ‘alternatieven’ gedeeld. Alternatieven zijn dus niet per definitie proefdiervrije methoden. In de eerste 20 jaar na het verschijnen van het boek van Russell & Burch bleef de impact beperkt. Pas toen in de jaren 70 en 80 radicale groeperingen de term alternatieven adopteerden, kregen de ideeën van Russell & Burch ook buiten de wetenschap de volle aandacht. Immers aan de uitvoer van dierproeven zitten morele dilemma’s. We erkennen de intrinsieke waarde van een proefdier en daarmee is het toebrengen van ongerief aan een proefdier onverenigbaar. Een 3V alternatief maakt het gebruik van proefdieren beter te aanvaarden. Later is ook het

principe van de 3V's in de Wet op de dierproeven (Wod) verankerd. Daarmee wordt uiting gegeven aan de wens van de maatschappij dierexperimenten af te wijzen. Inmiddels zijn de principes van de 3V's ook in de Europese wet en in de rest van de wereld verankerd.

2.1 Wet op de dierproeven (Wod)

In Nederland verscheen in 1977 de Wet op de dierproeven (Wod) die enkele jaren daarna van kracht werd, met als doel proefdieren te beschermen. De Wod is alleen van toepassing op gewervelde dieren. Bij de uitoefening van deze wet wordt de erkenning van de intrinsieke waarde van het dier als algemeen uitgangspunt gehanteerd en wordt het 'nee, tenzij' principe gehanteerd. Het doen van dierproeven is verboden, tenzij het doel van het experiment opweegt tegen het ongerief dat het proefdier moet ondergaan en er geen andere manier is om aan de benodigde informatie te komen. In artikel 10 van de Wod is dit als volgt gedefinieerd. Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel

- a. dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is;
- b. waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.

Het uitvoeren van een dierproef wordt gezien als 'noodzakelijk kwaad'; "zij kunnen vooralsnog niet worden gemist, maar er is alle aanleiding toe om geen dierproeven toe te passen wanneer deze proeven kunnen worden vervangen door andersoortige waarbij geen dieren hoeven te worden gebruikt" (R.J.H. Kruisinga, staatssecretaris van Sociale Zaken en Volksgezondheid, 1970).

In 1997 vond de belangrijkste herziening van de Wod plaats naar aanleiding van de implementatie van de Europese proefdierrichtlijn (86/609/EEG). Het is verboden een dierproef uit te voeren, zonder dat daar voorafgaand vergunning voor is

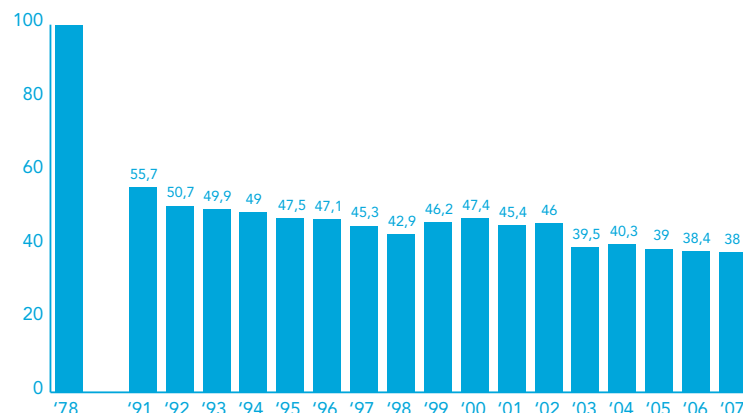
verleend aan de vergunninghouder en de proefopzet van een positief advies is voorzien door een erkende dierexperimentencommissie (DEC). De DEC, die is belast met advisering betreffende de uitvoer van dierproeven, bestaat uit deskundigen op het gebied van dierproeven, van alternatieven voor dierproeven, van proefdieren en hun bescherming, en van de ethische toetsing. De wet voorziet eveneens in de bepaling dat dierproeven enkel mogen worden uitgevoerd door gekwalificeerd personeel (zogenaamde art.9 en art.12 medewerkers). In de wet wordt sindsdien ook expliciet bepaald dat een dierproef niet mag worden verricht indien het doel van de proef ook kan worden verkregen op andere wijze dan door middel van een dierproef, dan wel door middel van een dierproef waarbij minder dieren worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend. Dit betreft de wettelijke verankering van de 3Vs. In 2003 werd er nog een beperkte wijziging van de Wod doorgevoerd. Daarbij werd het onderzoek met alle mensapen (o.a. chimpansee) en andere wilde dieren, die niet gefokt zijn als proefdier verboden. In 2005 is de Wod uitvoerig geëvalueerd, naar verwachting zal de Wod aangepast worden op basis van de herziening van de Europese proefdierrichtlijn². Voordat ik verder in ga op de mogelijke alternatieven voor dierproeven is het van belang eerst te kijken om hoeveel proefdieren het nu gaat in Nederland en waarvoor ze worden gebruikt.

2.2 Aantal dierproeven in Nederland

In 1978 werden voor het eerst dierproeven geregistreerd. Het aantal proefdieren in Nederland was toen ruim 1,5 miljoen. De jaren daarna daalde het aantal proefdieren, welke sinds eind jaren negentig stabiliseerde tot 45% van totaal aantal dieren dat in 1978 werd gebruikt. Rond 2000 was er een lichte toename van het gebruik van proefdieren door de introductie van transgene dieren. De forse afname gezien in 2003 is (waarschijnlijk) te wijten aan de uitbraak van de vogelpest (*Aviaire Influenza*), waardoor het vervoer van veel proefdieren aan banden werd gelegd en er dientengevolge veel minder kippen werden gebruikt. Het aantal proefdieren in 2007 bedroeg 597.605. Dit is 1% minder dan er in

2006 geregistreerd waren³. We hebben dus de laatste 10 jaar een duidelijke afname gezien ten opzichte van het aantal dierproeven daarvoor. Op dit moment is het percentage gebruikte dieren 38% vergeleken met het peiljaar 1978 (figuur 1).

Figuur 1
Percentage dierproeven
verricht in jaren 1991 tot
2007 in vergelijking tot
het aantal dierproeven
in 1978



Het merendeel van de dieren dat wordt gebruikt zijn muizen en ratten (70% van het totaal). In 2007 werden minder dierproeven verricht met (genetisch gemodificeerde) muizen en kippen, maar meer met vissen (stijging van 5%). Dit markeert het begin van de toename van de zebravis als proefdiermodel. Opvallend is verder dat het aantal dierstudies voor veiligheidsonderzoek in 2007 licht is toegenomen, in het bijzonder voor onderzoek naar aangeboren afwijkingen (teratogeniteitsonderzoek). De mate van ongerief die gepaard gaat bij de uitvoering van proeven is bij de meeste dierproeven (54% van het totaal) gering tot matig. Het aantal dieren dat ernstig ongerief ondervond (3% van het totaal) is in 2007 verder afgenomen.

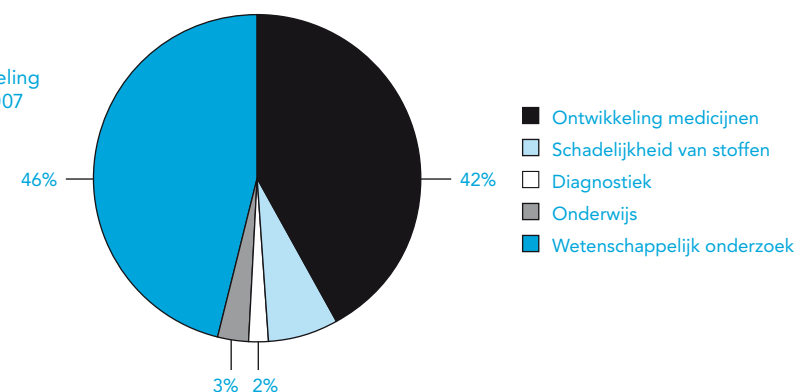
2.3 Waar worden de dierproeven voor gebruikt?

Het doel van de dierproeven wordt onderverdeeld in vijf bij de wet vastgestelde hoofddoelen, te weten:

- 1 ontwikkeling van medicijnen, inclusief kwaliteitscontrole van vaccins (42%)
- 2 beoordeling van de schadelijkheid van stoffen, exclusief medicijnen (7%)
- 3 diagnostiek (2%)
- 4 onderwijs (3%)
- 5 wetenschappelijk onderzoek (46%)

Het wetenschappelijk onderzoek richt zich naast fundamenteel onderzoek voornamelijk op onderzoek naar werkingsmechanismen van ziekten bij de mens, zoals geestesziekten, kanker, allergische aandoeningen en hart- en vaatziekten. (fig 2)

Figuur 2
Percentuele verdeling
dierproeven in 2007



Dierproeven met het doel de mogelijke schadelijke werking van cosmetica en toiletartikelen te onderzoeken zijn in Nederland sinds 1997 verboden. Ook op Europees niveau zal hiervoor een verbod in werking treden (zie 4.2). Ook mogen er geen zogenaamde LD50 studies meer worden uitgevoerd^a.

^a dit zijn studies waarbij de hoeveelheid van een stof die bij 50% van de dieren tot de dood leidt en is een maat voor de acute toxiciteit

Ter vergelijking in heel Europa worden 11,6 miljoen dieren per jaar gebruikt (cijfers uit 2005). Waarvan 25% voor veiligheidsonderzoek van voedsel en medicijnen werden gebruikt. Het aantal dieren dat gebruikt wordt om ingrediënten voor cosmetica te testen is zeer gering (ongeveer 9.000), maar na het verbod dat in maart 2009 van kracht gaat, zal dat aantal verder omlaag gaan. Het totaal aantal geregistreerde proefdieren in Europa is de afgelopen jaren toe genomen. Hetgeen voornamelijk toegeschreven wordt aan de toetreding van nieuwe lidstaten en harmonisatie van de registratie. In Nederland worden ook dieren geregistreerd die worden gedood zonder voorafgaande handeling, bijvoorbeeld voor gebruik van weefsels en organen (ex vivo). Dit is wordt niet in alle landen op deze wijze gedaan. Wereldwijd worden er naar schatting 115 miljoen proefdieren per jaar gebruikt.

Samengevat kan men vaststellen dat dierproeven voor verschillende doeleinden worden uitgevoerd, zowel voor fundamenteel als toegepast onderzoek. Voor dat stoffen mogen worden getest in mensen, wordt de werkzaamheid van stoffen in relatie tot ziekten, als ook de veiligheid voor mensen, dieren en milieu onderzocht met behulp van proefdieren. Veel innovaties, op medisch en technisch vlak, zijn tot stand gekomen door de inzet van proefdieren. De Stichting Informatie Dierproeven en patiëntenorganisaties laten zien dat proefdieren een belangrijke rol hebben gespeeld en tot op heden onmisbaar zijn voor de kennisontwikkeling en de medische vooruitgang⁴.

“3V'S: VERFIJNING, VERMINDERING EN VERVANGING”

pag
75

hoofdstuk 3
Kan het ook anders?
Wat zijn de
'alternatieven'?

lectoraat
Innovative Testing
in Life Sciences &
Chemistry

onderwerp
Innovative Testing
Grenzen verleggen &
bruggen bouwen

3 / KAN HET OOK ANDERS? WAT ZIJN DE 'ALTERNATIEVEN'?

In het voorgaande hoofdstuk hebben we gezien hoeveel proefdieren er worden gebruikt en wat het doel is van deze experimenten. Maar omdat er morele dilemma's zitten aan het uitvoeren van dierproeven, is er tegelijkertijd een groeiende behoefte om over alternatieve voor dierproeven te beschikken. We zijn op zoek, zowel in de wetenschappelijke wereld als ook in de maatschappij, naar modellen die beter voorspellend zijn. Vanuit een wetenschappelijk oogpunt is er behoefte aan alternatieve methoden, voor het doorbreken van het paradigma dat alleen proefdieren als meest geschikt model voor de mens kunnen dienen. De diermodellen die gebruikt worden in het biomedisch onderzoek hebben hun beperkingen en de voorspelbaarheid voor de mens is niet voor alle modellen even goed. Denk hierbij aan de problematische extrapolatie van knaagdier naar mens door de grote verschillen in fysiologie en metabolisme. Zoals ook Raymond Pieters heeft aangegeven is er grote behoefte aan humane modellen die de vertaling van 'bench' (laboratorium) naar 'bed' (de mens) verbeteren. Naast morele motieven kunnen hier ook de economische motieven genoemd worden. Dierproeven zijn over het algemeen tijdrovend en kostbaar. Kosteneffectieve alternatieven om de ontwikkeling van nieuwe producten te versnellen zijn meer dan welkom, zeker in het huidige economische klimaat.

De terechte vraag is dan ook: Kan het ook anders? Wat zijn de alternatieven? Het is bij wet verboden een dierproef uit te voeren indien er alternatieven bestaan om datzelfde doel te bereiken. Hiermee is expliciet in de Wod de maatschappelijke wens van de 3V's: Vervanging, Vermindering en Verfining van dierproeven verwoord. Wat verstaan we precies onder deze begrippen?

3.1 Verfijning

Onder verfijning van dierproeven verstaan we alle mogelijke maatregelen die het ongerief dat wordt berokkend aan het proefdier kunnen verminderen. Denk hierbij aan het gebruik van pijnstillers na operaties en de juiste verdoving bij chirurgische ingrepen. Maar ook sociale (i.p.v. individuele) huisvesting met kooiverrijking, zodat dieren minder gestresst zijn. Als dieren minder gestresst zijn vertonen de resultaten minder variatie. De proefdierkunde is bij uitstek de specialisatie die zich hiermee bezighoudt. Ook training en onderwijs aan onderzoekers, dierenartsen, diervverzorgers en DEC-leden op het gebied van de toepassing van humane eindpunten draagt bij aan de verfijning van dierproeven. Een humaan eindpunt kan worden gedefinieerd als het punt waarop de pijn of het lijden van een proefdier wordt beëindigd of verminderd door een actieve ingreep in de vorm van euthanasie, beëindiging van de pijnlijke procedure of door een pijnstillende en kalmerende medicatie. Het Nationaal Centrum Alternatieven voor dierproeven heeft met dit doel een CD-rom uitgebracht '*Humane endpoints in laboratory animal experimentation*'⁵.

3.2 Vermindering

Onder vermindering verstaan we de mogelijkheid om met minder dieren het doel te bereiken waarvoor de dierstudie wordt uitgevoerd. Dit kan bijvoorbeeld door andere statistische methodieken te gebruiken of meer parameters per dier te meten. Ook kan het gebruik van genetisch identieke dieren er toe leiden dat er minder variatie in de response is te verwachten waardoor minder dieren per groep ingezet hoeven te worden. Soms is het ook mogelijk om een dier in de tijd te volgen, waarbij ieder dier zijn eigen controle is en er geen extra controle- dieren nodig zijn. Denk hierbij aan het gebruik van telemetrie en imaging technieken. Het gestructureerd zoeken in literatuur en databases kan voorkomen dat dierstudies onnodig worden uitgevoerd of alternatieven niet optimaal worden toegepast. De Universiteit van Nijmegen heeft een 3V Research Centrum opgezet dat onderzoekers helpt de 3V's te vinden en toe te passen⁶.

3.3 Vervanging, een 'middel anders dan een dierproef'

Tot op heden is de focus wat betreft alternatieven voornamelijk geweest op *in vitro* methoden om dierproeven te vervangen. In dit kader is het van belang een aantal termen, die veel gebruikt worden als het gaat om alternatieven, te definiëren:

- *in vitro* (Latijn: *in glas*) methoden zijn experimenten waarbij gebruikt gemaakt wordt van geïmmortaliseerde cellen (cellijnen die ongeremd kunnen doorgroeien) of micro organismen die gekweekt kunnen worden. Het kunnen humane cellen zijn, maar ook afkomstig van dieren.
- *in vivo* (Latijn: *in het leven*) is de term die wordt gebruikt voor onderzoek dat gebruik maakt van levende organismen (gewerveld en ongewerveld). Strikt genomen valt hier ook onderzoek bij mensen onder. Echter hiervoor wordt meestal de term humaan (klinisch) onderzoek gebruikt.
- *ex vivo* (Latijn: *buiten het leven*) hiermee wordt bedoeld het kweken van cellen, weefsel of organen afkomstig van levende organismen. Meestal worden deze cellen vers uit organismen gehaald en kunnen daarna voor beperkte duur in leven worden gehouden.
- *in silico* (verwijzend naar een belangrijk onderdeel van computerchips: silicium). Hiermee worden bedoeld computermodellen, zoals structuur-activiteitsrelaties en elektronische databases.

“TESTEN VAN TOXICITEIT IN DE 21STE EEUW: NADEREN WE EEN WETENSCHAPPELIJK KEERPUNT?”

pag
79

hoofdstuk 4
Recente ontwikkelingen rondom het beleid alternatieven voor dierproeven

lectoraat
Innovative Testing
in Life Sciences &
Chemistry

onderwerp
Innovative Testing
Grenzen verleggen &
bruggen bouwen

4 / RECENTE ONTWIKKELINGEN RONDOM HET BELEID ALTERNATIEVEN VOOR DIERPROEVEN

4.1 Nationaal beleid

Op politiek niveau is er veel beweging omtrent het dossier ‘alternatieven voor dierproeven’. Na vele Tweede Kamer vragen rondom de ontwikkeling en financiering van alternatieven voor dierproeven volgde in juni 2008 de publicatie van de kabinetsvisie ‘Alternatieven voor Dierproeven’⁷. Het is voor het eerst dat er een kabinetsvisie over dit onderwerp is verschenen, waarmee het stimuleren van alternatieven voor dierproeven hoger op de agenda is geplaatst. De ontwikkeling van alternatieve methoden wordt door de overheid gestimuleerd door middel van het ZonMw subsidieprogramma ‘Proefdieren begrensd’, gesteund door de ministeries VWS, VROM, LNV, Defensie, EZ en OCW. Vanaf 2009, zal in het programma naast ontwikkeling van nieuwe 3V methoden, meer aandacht besteed worden aan de validatie en implementatie van deze methoden⁸. Hier dient zeker ook vermeld te worden dat Vereniging Proefdiervrij in dit nieuwe programma financieel gaat bijdragen aan de ontwikkeling van proefdiervrije methoden. Dit is een goede ontwikkeling en hopelijk doet een goed voorbeeld goed volgen. Naast het ZonMw programma zijn gelden beschikbaar gesteld voor de ontwikkeling van alternatieve methoden via het Nederlands Genomics Initiative (NGI), het Nederlands Toxicogenomics Center (NTC) en het *Assuring Safety without Animal Testing* (ASAT) programma (zie 7.2). Deze programma’s zijn niet primair bedoeld voor de ontwikkeling van alternatieven voor dierproeven op korte termijn, maar zullen naar verwachting op langere termijn wel bijdragen aan die ontwikkeling. Er bestaat vanuit de politiek meer belangstelling dan voorheen, maar het is vraag of de financiële middelen die nu beschikbaar zijn toereikend zijn om dit complexe vraagstuk daadwerkelijk vooruit te brengen. Helaas moeten we vaststellen dat de beoogde financiële middelen die vrij zijn gemaakt voor de uitvoering van de kabinetsvisie niet met dezelfde ambities mee omhoog zijn gegaan.

4.2 Internationaal beleid

Op Europees niveau wordt al geruime tijd gewerkt aan de herziening van de richtlijn 86/609/EEG betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt. In november 2008 verscheen het voorstel voor de herziening van deze wet⁹. In grote lijnen geeft de herziening de Nederlandse situatie weer. Met deze richtlijn wordt beoogd het toezicht op het gebruik van laboratoriumdieren en de ethische toetsing te verbeteren. Het tweede doel van deze richtlijn is het verlagen van het aantal dieren in experimenten door de ontwikkeling en validatie van alternatieve methoden te bevorderen. In het zogenaamde Zesde en Zevende kaderprogramma (FP6 2002-2006; FP7 2007-2013) van de Europese commissie worden een groot aantal projecten gefinancierd die de ontwikkeling van 'Alternative Testing Strategies' stimuleren. In het Zesde kaderprogramma zijn in totaal 21 projecten gefinancierd waarbij het gaat om totaal 60 miljoen Euro¹⁰. In het Zevende kaderprogramma ligt de nadruk op ontwikkeling van alternatieven voor farmacologie en toxicologie. In november 2005 is de *European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing* (EPAA) opgericht. Dit is een samenwerking tussen overheid, brancheorganisaties en individuele bedrijven. De EPAA heeft als doel om de ontwikkeling van alternatieven voor dierproeven te stimuleren, om validatie en acceptatie van nieuwe testmethoden te bespoedigen, uitwisselen van informatie tussen verschillende sectoren te bevorderen en de dialoog met autoriteiten te initiëren. In de Verenigde Staten verscheen in 2007 een rapport van de National Research Council, getiteld 'Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy'¹¹. Hierin wordt een langetermijnvisie gepresenteerd op het testen van de toxiciteit in de 21^{ste} eeuw. Echter de implementatie van deze visie vraagt om een grote gezamenlijke strategische inspanning. Zoals collega Prof. Bas Blaauboer recentelijk in zijn inaugurele rede aangaf: 'Verplichte leesstof voor iedereen werkzaam in de toxicologie'. Ik kom hier later nog op terug.

“REACH EN HET COSMETICA DIRECTIEF: ZITTEN WE OP DE JUISTE KOERS?”

pag
83

hoofdstuk 5
Wetgeving en de
ontwikkeling van
nieuwe stoffen

lectoraat
Innovative Testing
in Life Sciences &
Chemistry

onderwerp
Innovative Testing
Grenzen verleggen &
bruggen bouwen

5 / WETGEVING EN DE ONTWIKKELING VAN NIEUWE STOFFEN

In de voorafgaande hoofdstukken hebben we gezien dat het merendeel van de dierexperimenten wordt uitgevoerd voor de ontwikkeling van nieuwe stoffen en medicijnen. Hierbij worden zowel de werkzaamheid (*efficacy*) als veiligheid (*safety*) van stoffen bestudeerd. Een groot deel van dit werk komt voort uit wettelijke verplichtingen. Naar schatting wordt ongeveer 25% van alle dierproeven uitgevoerd op grond van wettelijke bepalingen in of buiten de EU ('verplicht' onderzoek). De wetgeving in dit veld is paradoxaal. Enerzijds zijn voor de toelating van nieuwe stoffen en medicijnen dierstudies vereist, anderzijds wil men het gebruik van proefdieren tot het minimum beperken. Dit maakt het voor de bedrijven die veilig en verantwoord willen vernieuwen niet makkelijk. Het is belangrijk dat men zich realiseert dat de verschillende segmenten in de markt ieder hun eigen beweegredenen hebben om de ontwikkeling van innovatieve en alternatieve methoden te stimuleren en te initiëren. Een effectieve manier van testen zal tijd besparen en kosten verlagen, maar een beleid gericht op de vermindering van proefdieren past ook bij de strategie van maatschappelijk verantwoord ondernemen. Ik zal hierna per marktsegment aangeven welke trends er gaande zijn met betrekking tot alternatieven voor dierproeven.

5.1 Chemie

Voor wat betreft de veiligheidsbeoordeling van bestaande en nieuwe chemicaliën is in Europa sinds juni 2007 de REACH wetgeving van kracht. REACH staat voor Registratie, Evaluatie, Autorisatie en Restrictie van Chemicaliën¹². Het doel van REACH is om in betrekkelijk korte tijd (11 jaar) een grote groep van meer dan 30.000 bestaande chemicaliën te evalueren, waarvan we tot nu toe nog weinig weten ten aanzien van hun veiligheid voor mens en milieu. Dit is een grote uitdaging gezien het feit dat de afgelopen 14 jaar slechts 141 stoffen zijn geëvalueerd. Als al deze

stoffen beoordeeld zouden worden met behulp van de huidige teststrategieën zou dit zeer lang duren en zeer veel proefdieren kosten. Het is belangrijk ons te realiseren dat het doel van deze wet niet is een volledige wetenschappelijke veiligheidsbeoordeling uit te voeren, maar op korte termijn de meest schadelijke stoffen voor mens en milieu te identificeren en indien noodzakelijk hun risico's verder te beperken. De nadruk zal in eerste instantie liggen op de identificatie van kankerverwekkende stoffen, stoffen schadelijk voor het nageslacht (reproductie toxiciteit) en stoffen die zeer schadelijk zijn voor het milieu en in grote volumina worden geproduceerd.

De schattingen over het aantal proefdieren dat voor REACH nodig zijn, lopen uiteen van 4 miljoen tot het 10-voudige daarvan, voornamelijk door reproductie toxiciteitstesten waarvoor zeer veel dieren worden gebruikt¹³. Het mag duidelijk zijn dat dit niet wenselijk is en daarom worden alternatieve manieren gezocht om de veiligheid van deze stoffen retrospectief te kunnen beoordelen. REACH schrijft voor dat zoveel mogelijk gebruik gemaakt moet worden van bestaande gegevens en testen zonder proefdieren. Denk hierbij aan computermodellen en methoden gebaseerd op chemische structuur verwantschap, *in vitro* methoden, maar ook de mogelijkheid om niet te hoeven testen omdat er geen blootstelling wordt verwacht^b. Wettelijk is bepaald dat dierstudies alleen in laatste instantie mogen worden uitgevoerd. Helaas zijn er voor de evaluatie van toxicologische effecten die veel proefdieren kosten, zoals reproductietoxiciteit, nog geen proefdiervrije alternatieven voorhanden en deze zullen hoogst waarschijnlijk ook niet op korte termijn beschikbaar komen. Om in de korte tijd die resteert de inzet van dierproeven tot een minimum te beperken, moet gezocht worden naar andere teststrategieën. Verwacht wordt dat de meeste winst op korte termijn is te behalen in verfijning en vermindering van dierproeven.

5.2 Cosmetica

In navolging van het Nederlandse verbod is in 2003 door het Europese Parlement de Cosmetica Richtlijn geamendeerd, in het zogenaamde '7th Amendment on the Cosmetic Directive'¹⁴.

^b 'exposure based waiving'

Deze Richtlijn verbiedt in Europa vanaf 11 maart 2009 het uitvoeren van dierproeven ten behoeve van de beoordeling van de veiligheid van ingrediënten die gebruikt worden voor cosmetica (dit is inclusief producten voor persoonlijke verzorging zoals shampoo en zonnebrandcrèmes). Daarnaast voorziet de Richtlijn ook in een handelsverbod, hetgeen inhoudt dat producten en ingrediënten die geproduceerd zijn buiten Europa en op proefdieren zijn getest niet in Europa op de markt gebracht mogen worden.

Hoe ver zijn we nu gevorderd met het ontwikkelen en valideren van proefdiervrije methoden? Zitten we op de juiste koers? In 2004 is een inventarisatie gemaakt van alle proefdiervrije methoden die beschikbaar zijn voor de verschillende schadelijke effecten (toxicologische eindpunten)¹⁵. Het was de verwachting dat vóór 2009 voor een aantal acute schadelijke effecten een gevalideerd alternatief beschikbaar zou zijn. Maar voor de complexere effecten, waarvoor de wet pas in 2013 in werking treedt, zoals chronische toxiciteit, reproductie toxiciteit, sensibilisatie (overgevoeligheid) en kinetiek, zal dat niet zal gaan lukken. Om de veiligheid van cosmetica te kunnen blijven garanderen en de innovatie niet stop te zetten, werkt de Europese brancheorganisatie van cosmeticabedrijven (COLIPA) in samenwerking met het *European Centre for Validation of Alternative Methods* (ECVAM) en verschillende kennisinstituten aan de ontwikkeling van proefdiervrije methoden, bijvoorbeeld door gebruik te maken van zogenaamde gereconstrueerde 3D huidmodellen¹⁶.

5.3 Farma

Zoals eerder geschetst, kampt de farmaceutische industrie met het probleem dat er te weinig nieuwe medicijnen op de markt komen en tegelijkertijd de patenten van oude medicijnen aflopen. Er zitten nog wel potentiële medicijnen in de pijplijn, maar de kosten die gemaakt moeten worden om een nieuw medicijn op de markt te zetten, stijgen zeer snel. Daarnaast blijken veel potentieel nieuwe medicijnen in de mens toch niet het gewenste resultaat te laten zien of hebben te veel bijwerkingen. De vertaling (translatie)

van proefdier naar mens blijkt niet eenvoudig. Het uitvalspercentage moet derhalve omlaag^c. Dit betekent dat er modellen ontwikkeld moeten worden die beter voorspellend zijn voor de mens, en bij voorkeur ook kosteneffectief zijn. Daarvoor wordt gezocht naar de mogelijkheid om gebruik te maken van humaan weefsel en computermodellen, die beter het gedrag van stoffen in de mens kunnen nabootsen en voorspellen. Tot nu toe zijn op het gebied van alternatieven voor dierproeven de meeste ontwikkelingen gericht op veiligheidsonderzoek voor chemische stoffen. De verwachting is dat in de nabije toekomst meer aandacht zal zijn voor het onderzoek naar de effectiviteit van medicijnen. Daar worden veel meer dieren voor gebruikt en is er dus mogelijk meer 'winst' te behalen in termen van proefdierversmindering. Voor nieuwe medicijnen zoals 'biologicals' zijn bijvoorbeeld de huidige diermodellen niet geschikt en zullen alternatieve methoden ontwikkeld moeten worden.

5.4 Voeding

Ook ingrediënten die gebruikt worden in onze voeding moeten verplicht getest worden op dieren. Deze ingrediënten kunnen chemisch gesynthetiseerd worden of natuurlijke producten zijn die verkregen zijn uit bijvoorbeeld planten en kruiden (zogenaamde 'phytochemicals'). Maar ook eiwitten, vetten en koolhydraten die in meer op mindere wijze gemodificeerd zijn en niet eerder geconsumeerd zijn, worden beschouwd als 'novel foods' en dienen geëvalueerd te worden als nieuwe stof. Soms is er ook sprake van mengsels van stoffen, zoals bijvoorbeeld de rook-smaakstoffen (*smoke flavours*) afkomstig van verbrand hout. Zoals eerder door Raymond Pieters aangegeven kunnen natuurlijke stoffen ook als geneesmiddel worden gebruikt. Deze stoffen die een gezondheidsbevorderende werking zouden hebben, worden toegevoegd aan onze voeding. De *European Food Safety Authority* (EFSA) houdt toezicht op de wetenschappelijke onderbouwing van dergelijke gezondheidsclaims¹⁷. Denk bijvoorbeeld aan Becel Proactiv, met toegevoegde plantensterolen die cholesterol verlagen, maar dat het risico op hart- en vaatziekten verlaagt mag niet worden geclaimd. Of Activa van

^c 'dit wordt ook wel 'attrition rate' genoemd en is uitvoerig besproken in de rede van Raymond Pieters

Danone met probiotica dat de stoelgang activeert. De effectiviteit van deze claims moet onderbouwd worden met studies, bij voorkeur bij de mens, maar hier worden ook dierproeven voor gebruikt. De vraag is echter of knaagdieren een geschikt model zijn. We weten immers dat fysiologische processen, zoals het cholesterol metabolisme en de samenstelling van de darmflora, enorm verschillen tussen knaagdieren en de mens.

Bovenstaande geeft aan dat naast wettelijke eisen, ook vanuit het bedrijfsleven behoefte is aan alternatieve methoden voor efficiënte en snellere ontwikkeling van nieuwe producten, dus voor verantwoorde vernieuwing. Vanuit de diverse industrieën kan de reden voor de behoefte aan een alternatief verschillend zijn, maar de doelstelling; namelijk beter voorspellende methoden te ontwikkelen en tegelijkertijd kosteneffectief te kunnen meten, geldt voor het hele bedrijfsleven. Alternatieve methoden zijn niet per definitie sneller en goedkoper, wat voor de industrie een reden kan zijn een alternatieve methode toch niet toe te passen. Een voorwaarde om alternatieve methoden te kunnen gebruiken, is dat deze methoden geaccepteerd worden door regelgevende autoriteiten. Een minimaal vereiste voor acceptatie is dat een methode gevalideerd is.

In het volgende hoofdstuk zal ik ingaan op de wijze waarop methoden nu gevalideerd worden. Tevens zal ik aandacht besteden aan succesvolle, door regelgevers geaccepteerde, en toegepaste alternatieven en de lessen die we hieruit hebben geleerd.

“ACCEPTATIE IS BELANGRIJKER DAN VALIDATIE”

pag
89

hoofdstuk 6
Validatie en acceptatie
van alternatieven; wat
zijn de obstakels?

lectoraat
Innovative Testing
in Life Sciences &
Chemistry

onderwerp
Innovative Testing
Grenzen verleggen &
bruggen bouwen

6 / VALIDATIE EN ACCEPTATIE VAN ALTERNATIEVEN; WAT ZIJN DE OBSTAKELS?

6.1 Validatieprocessen

ECVAM is in 1991 opgericht door de Europese Commissie met als doel de validatie van alternatieve methoden te coördineren op Europees niveau en de dialoog tussen wetgevers, industrie, wetenschappers, consumenten en dierwelzijnorganisaties te stimuleren, en op die manier de acceptatie van proefdiervrije methoden te bevorderen. Om de kwaliteit van de alternatieve modellen te waarborgen heeft ECVAM validatiecriteria opgesteld¹⁸. Het validatieconcept beschrijft verschillende fasen die doorlopen moeten worden voordat een onafhankelijke commissie de resultaten beoordeelt en een verklaring opstelt over de validatie status. Na de ontwikkelingsfase volgen verschillende fasen waarin de volgende aspecten worden onderzocht:

- reproduceerbaarheid
- overdraagbaarheid (*transferability*)
- tussen-laboratorium variabiliteit
- pre-validatie
- validatie

In de validatiefase is de keuze voor de stoffen die getest gaan worden van cruciaal belang. Het is belangrijk dat er een evenwichtig aantal positieve en negatieve stoffen worden geselecteerd en dat er voldoende betrouwbare *in vivo* gegevens beschikbaar zijn. Na een formele wetenschappelijke validatiestudie, zoals hierboven beschreven, vindt er nog een acceptatiefase plaats, waarin de methode ook daadwerkelijk geïmplementeerd en geaccepteerd moet worden door de verschillende regelgevende instanties. Niet zelden vinden er langdurige discussies plaats in internationale platforms. Wereldwijde harmonisatie en acceptatie van validatie-data zou dit proces kunnen versnellen. Hier wordt door organisaties, o.a. door de Amerikaanse *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) hard aan gewerkt, maar dit is een moeizame en lange weg. Validatie is dus belangrijk maar uiteindelijk gaat het om acceptatie door de

regelgever. De uiteindelijke implementatie vindt meestal plaats door opstelling van internationale richtlijnen. Dit hele proces neemt minimaal 10-15 jaar in beslag. Als we in dit tempo doorgaan, gaat het nog heel lang duren voordat alle dierproeven de wereld uit zijn.

Wetenschappelijk onderbouwde en betrouwbare testen die robuust en reproduceerbaar zijn, zijn een absolute voorwaarde voor acceptatie. De modellen worden technisch gezien steeds complexer, bijvoorbeeld van een enkele cellijn naar het gebruik 3D modellen en van meerdere celtypes in co-culturen bij elkaar. Het vergroten van de complexiteit van een systeem om beter de *in vivo* situatie na te bootsen, gaat soms ten koste van de robuustheid, de uitwisselbaarheid en de reproduceerbaarheid. Echter de eisen die gesteld worden aan de validatie van een *in vitro* methode dienen niet anders te zijn dan van een nieuwe *in vivo* test. Veel diermodellen zijn nooit formeel gevalideerd, maar geaccepteerd op basis van beschikbare data.

6.2 Acute versus complexe schadelijke effecten

Eind jaren 80 is door TNO-collega Menk Prinsen de 'Isolated Chicken Eye test' ontwikkeld. Deze methode maakt gebruik van kippenogen afkomstig uit slachthuis om de bijtende en/of irriterende werking van stoffen te meten (foto 2). Hoewel deze methode gevalideerd is voor oogirritatie, worden de resultaten slechts deels geaccepteerd. Alleen zeer corrosieve (bijtende) stoffen die uiteraard een response geven in deze test hoeven niet bevestigd te worden in een dierexperiment. Negatieve resultaten, dat wil zeggen wanneer er geen effect gemeten wordt, moeten meestal nog bevestigd worden *in vivo*. De gedachte daar achter is dat vals positieve resultaten^d geen risico vormen voor de consument, maar een vals negatief resultaat^e mogelijk wel een risico vormt voor de mens. Gelukkig zijn de meeste stoffen niet corrosief of irriterend, maar dit betekent dat er nog veel dierexperimenten uitgevoerd moeten worden.

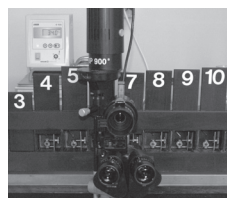


Foto 2

^d vals positief betekent dat een effect gemeten is in het testsysteem, maar in de mens blijkt dit niet het geval

^e vals negatief betekent er wordt geen effect gemeten in het testsysteem maar in de mens blijkt dit wel het geval te zijn

Binnen de genetische toxicologie hanteren we het omgekeerde principe; dat wil zeggen alleen stoffen die *in vitro* een positief effect laten zien moeten *in vivo* bevestigd worden. Voor elke methode geldt dat de opzet van de test zo gekozen is dat de gevoeligheid (sensitiviteit) zo hoog mogelijk is, zodat de kans op vals negatieve resultaten zo klein mogelijk is. Helaas gaat een hoge gevoeligheid vaak gepaard met een afname van de specificiteit en dus een toename van het aantal vals positieve stoffen. Deze 'overgevoelige' *in vitro* genotoxiciteitstesten leiden tot onnodige *in vivo* testen. Er zit dus ook een keerzijde aan de benadering om de *in vitro* testen steeds gevoeliger te maken. Bij de ontwikkeling van een nieuwe testmethode is het dus van belang dat zowel positieve als negatieve resultaten worden geaccepteerd.

Als we de lijst met gevalideerde testen bekijken is duidelijk dat voor zogenaamde acute en lokale effecten (zoals oog- en huidirritatie en acute orale toxiciteit) alternatieve methoden zijn ontwikkeld. Voor complexe schadelijke effecten die door interactie van verschillende processen in het lichaam ontstaan na herhaalde blootstelling, zoals kanker, allergie en reproductie toxiciteit, blijkt dit veel moeilijker en gaan de ontwikkelingen langzaam. Waarom zijn alternatieve methoden voor complexe schadelijke effecten tot op heden niet of nauwelijks beschikbaar? Het is gebleken dat zogenaamde 'single replacements' dus één dierproef wordt vervangen door één alternatieve methode beperkt succes heeft opgeleverd. De huidige modellen zonder proefdieren, voor de meer complexe schadelijke effecten zijn (nog) niet goed genoeg. Het lijkt een te simpele gedachte dat we een levend organisme eenvoudig kunnen nabootsen met een enkel celkweek experiment. Indien het mechanisme van het ontstaan van een ziekte of toxicologisch effect voldoende bekend is, kan men proberen elk onderdeel van de puzzel te vervangen door een *in vitro* experiment, resulterend in een batterij aan *in vitro* testen die alle fysiologische processen *in vivo* moet nabootsen. Dit is bijvoorbeeld ook het doel van het Zesde Kader project ReProTect¹⁹. De reproductie-cyclus is complex en bestaat uit vele

deelfacetten. Getracht wordt elk onderdeel van de reproductiecyclus na te bootsen met een of meerdere *in vitro* testen. Een volgende stap is de integratie van deze *in vitro* testen tot een teststrategie. Een belangrijke vraag hierbij is wel hoe een geïntegreerde batterij van *in vitro* testen gevalideerd kan worden?

6.3 Validatie ten opzichte van een dierproef

In de 'klassieke' validatiestudies zoals ze tot nu zijn uitgevoerd, worden resultaten van *in vitro* methoden vergeleken met *in vivo* dierproeven. De dierproef wordt als 'gouden standaard' genomen en stoffen getest in een alternatieve methode moeten dezelfde voorspelling (in kwantitatieve en kwalitatieve zin) opleveren als in de dierproef. Echter de (veelal oude) *in vivo* studies zijn niet gestandaardiseerd en de variatie in de resultaten van *in vivo* data is zeer groot. Vaak zijn *in vivo* gegevens vertrouwelijk, waardoor het ontbreekt aan voldoende betrouwbare *in vivo* data. Bovendien gaat men in de vergelijking tussen een alternatieve methode en een diermodel voorbij aan het feit dat de gegevens verkregen uit dierexperimenten niet altijd de juiste voorspelling voor de mens opleveren (overschatting voorspellende waarde van dierproeven). De vergelijking wordt nog complexer omdat bij alternatieve methoden de gemeten parameters meestal niet dezelfde zijn als die in dierexperimenten worden gemeten. Om de waarde van een alternatieve methode goed te kunnen beoordelen is het noodzakelijk dat het werkingsmechanisme in de mens (of proefdier) bekend is. Helaas zijn die mechanismen niet altijd bekend, zodat de toxische effecten niet goed *in vitro* kunnen worden nagebootst.

6.4 De successen, wat hebben we hier van geleerd?

Ondanks de enorme inspanningen die de laatste jaren zijn geleverd zijn er sinds 1991 slechts 25 alternatieven voor dierproeven, voornamelijk *in vitro* methoden, op Europees niveau wetenschappelijk gevalideerd (tabel 1).

Van deze gevalideerde methoden zijn een 13-tal methoden ook geaccepteerd door overheden. Dit zijn verschillende modellen voor het testen van de veiligheid van vaccins (3), huidcorrosie (4), huidabsorptie, fototoxiciteit (cytotoxische effecten van stoffen onder invloed van Ultra Violet licht) en verfijning modellen van LD50 studies (3) en sensibilisatie.

Waarom zijn deze alternatieve methoden succesvol geaccepteerd? Wat kunnen we er van leren? Voor de huidcorrosietesten geldt dat dit een zeer acuut effect is dat direct kan worden gemeten. In tegenstelling tot de huidirritatie waarbij subtiele effecten gemeten moeten worden, wordt in de huidcorrosietest een duidelijke parameter gemeten. Hierdoor kan een eenvoudig ja/nee antwoord gegeven worden. Voor de beide andere testen geldt dat ze geen vervanging zijn voor een al bestaande dierproef en een directe vergelijking met de mens mogelijk was. De voorspellende waarde voor de mens is bepaald en resultaten zijn niet (alleen) vergeleken met dierproeven. Dit heeft de acceptatie sterk bevorderd.

Het zal duidelijk zijn dat voor sommige schadelijke effecten dierproeven nog onmisbaar zijn. Om alle huidige dierproeven te vervangen met *in vitro* methoden is er nog een lange weg te gaan. In het volgende deel wil ik in gaan op de mogelijkheden om op korte (en middenlange) termijn het proefdiergebruik verder terug te brengen. Tot hoeveel vermindering van dierproeven dit gaat leiden is moeilijk te voorspellen. Daarbij speelt de houding ten aanzien van het gebruik van dierproeven en alternatieven binnen het life sciences onderzoek een cruciale rol. We zullen de huidige grenzen moeten verleggen en bruggen moeten bouwen naar andere vakgebieden.

Tabel 1 Gevalideerde methoden door het European Centre for the Validation of Alternative Methods, Italië (ECVAM).

Methode	Wetenschappelijk gevalideerd	Geaccepteerd door regelgevers
Huidcorrosie		
SkinEthic™ Human Skin Model	November 2006	-
CORROSITEX assay	December 2000	Juli 2006
EpiSkin™ skin corrosivity test	April 1998	April 2004
EpiDerm™ skin corrosivity test	Maart 1998	April 2004
Rat Transcutaneous Electrical Resistance (TER) skin corrosivity test	April 1998	April 2004
Oogirritatie		
The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and the Isolated Chicken Eye (ICE) test methods for eye irritation	April 2007	-
Huidirritatie		
EpiDerm SIT and SkinEthic RHE assay	November 2008	-
Artificial skin models (EPISKIN®, EpiDerm®)	April 2007	-
Gentoxiciteit		
In Vitro Micronucleus Test as an Alternative to the Chromosome Abberation Assay	November 2006	-
Acute toxiciteit		
Acute Toxic Class Method	Oktober 2007	December 2001
Fixed Dose Procedure	Oktober 2007	December 2001
Up-and-Down Procedure	Oktober 2007	December 2001

Huidsensibilisatie		
Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA)	April 2007	-
Local Lymph Node Assay for skin sensitisation (LLNA)	Maart 1999	April 2004
Embryotoxiciteit		
Embryonic stem cell test	Mei 2002	-
Micromass embryotoxicity assay	Mei 2002	-
Whole rat embryo embryotoxicity assay	Mei 2002	-
Fototoxiciteit		
3T3 Neutral Red Uptake (NRU) phototoxicity test	Mei 1998	April 2004
Acute aquatische toxiciteit		
Testing Strategy to Reduce the Use of Fish in Acute Aquatic Toxicity Testing	Maart 2006	-
Huidabsorptie		
In vitro tests for percutaneous absorption	-	April 2004
Kwaliteitscontrole Vaccins	-	
ELISA test for batch potency testing of erysipelas vaccines	-	2004
ELISA test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use	-	March 2003
Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use	-	March 2003

“BETERE VOOR- SPELLING DOOR GEBRUIK HUMANE MODELLEN”

pag
97

hoofdstuk 7
Hoe kunnen we de
toepassing van alter-
natieve methoden
versnellen?

lectoraat
Innovative Testing
in Life Sciences &
Chemistry

onderwerp
Innovative Testing
Grenzen verleggen &
bruggen bouwen

7 / HOE KUNNEN WE DE TOEPASSING VAN ALTERNATIEVE METHODEN VERSNELLEN?

In het vorige hoofdstuk hebben we gezien dat de huidige validatie van alternatieve methoden een langzaam proces is. Hoe kunnen we de toepassing van alternatieve methoden kunnen versnellen en het aantal proefdieren verder verminderen? De directe vergelijking van in vitro methoden met dierproeven lijkt achterhaald. Het zou beter zijn alternatieve methoden te valideren ten opzichte van de effecten bij de mens. Immers we zoeken een alternatief voor het beste proefmodel namelijk de mens en niet voor de rat.

7.1 De mens als proefkonijn

Om de modellen meer relevant te maken voor de humane situatie lijkt het voor de hand te liggen gebruik te maken van menselijk (humaan) materiaal. Urine, speeksel en bloed zijn relatief makkelijk te verkrijgen. Ook is het soms mogelijk te beschikken over humaan weefsel zoals biopten van huid, darm of andere organen. Uiteraard kan dit alleen met toestemming van de donor (*'informed consent'*^a). Een voorbeeld hiervan is het gebruik van humane huid, dat beschikbaar komt na cosmetische correcties.

Dit 'afvalmateriaal' kan gebruikt worden om de opname van stoffen te bepalen. Bij TNO is met dit materiaal recentelijk ook een model ontwikkeld dat de schade aan ons erfelijk materiaal (DNA) kan meten in huidcellen (foto 3). De extrapolatie van de resultaten verkregen in dit humane huidmodel, naar de mens wordt op deze manier vereenvoudigd. Immers de huidstructuur van de mens is heel anders dan die van knaagdieren. Ook enzymen die stoffen metaboliseren (omzetten in giftige dan wel minder giftige stoffen) in organen als huid, darm en lever kunnen enorm verschillen tussen verschillende soorten organismen. Uiteraard is de beschikbaarheid van humaan weefsel beperkt. Maar op verschillende plaatsen wordt gewerkt aan het opzetten van weefselbanken. Een andere belangrijke kanttekening die gemaakt dient te worden, bij het gebruik van humaan materiaal, zijn de

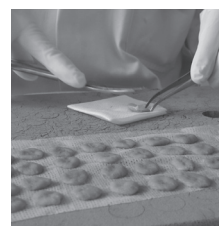


Foto 3

^a schriftelijke bevestiging waarmee men toestemming geeft biologisch materiaal te mogen gebruiken voor wetenschappelijk onderzoek

biologische verschillen tussen mensen (inter-individuele variatie). Ieder individu is verschillend, in tegenstelling tot de proefdieren die vaak genetisch identiek zijn en dus minder biologische variatie vertonen. Dit zou kunnen betekenen dat verschillende donoren moeten worden gebruikt. Aan de andere kant geeft het ook meer inzicht in de variatie die er is tussen mensen. Ook dienen er tijdig, met het oog op acceptatie in een latere fase, tijdig discussies worden gevoerd over welk materiaal wel en niet gebruikt mag worden en onder welke voorwaarden (denk bv aan embryonale stamcellen). Deze ethische discussies dienen zowel binnen als buiten de wetenschappelijke wereld gevoerd te worden. Het streven naar modellen die meer op de mens lijken is ook terug te vinden in het gebruik van transgene dieren. Meestal worden hier genetisch gemodificeerde muizen voor gebruikt, die humane genen bevatten die bijvoorbeeld coderen voor metabolisme of een ziekte. Hoewel dit uiteraard nog steeds een dierproef betreft, kunnen deze modellen meer inzicht geven in de mechanismen en ziekteprocessen bij de mens en op die manier beter de effecten van stoffen in de mens voorspellen.

Het beste proefdiermodel is natuurlijk de mens zelf, met uitzondering van onderzoek voor diervoeders, veterinaire medicijnen en het milieu. Zeker wat betreft het onderzoek naar de effecten van voedingsmiddelen, is een humane interventie studie vaak relevanter dan een dierexperiment. Echter als het gaat om het testen van stoffen waarvan nog geen veiligheidsgegevens beschikbaar zijn, stuit dit op grote ethische bezwaren. Zeker als het gaat om chemische stoffen waarvan het niet de bedoeling is dat de mens daar (in hoge mate) aan wordt blootgesteld. Op dit moment moeten er voldoende diergegevens aangeleverd worden alvorens de eerste studies in de mens mogen worden uitgevoerd. Het TNO *In vitro* Maagdarm model, ook wel TIM genoemd, is een computergestuurd model dat het spijsverteringskanaal van de mens nabootst. Dit dynamische model bestaat uit een maagdunne darm deel (TIM 1) en een dikke darm deel (TIM 2). Het model wordt gebruikt voor onderzoek naar het gedrag van geneesmiddelen en voedingsmiddelen in het menselijk lichaam.

Ook kan worden onderzocht wat de invloed is van verschillende fysiologische condities op de vorming van bijvoorbeeld toxische stoffen²⁰. Met dit model kunnen effecten onder humaan fysiologische omstandigheden worden nagebootst en is de noodzaak om dierproeven te doen aanzienlijk gereduceerd. *Microdosing* is een nieuwe techniek die het mogelijk maakt in de pre-klinische fase een zeer kleine hoeveelheid (eenhonderdste van verwachte therapeutische dosering) van een stof in de mens te doseren. Door analyse van de stof en de metabolieten kan al in vroeg stadium de kinetiek en het metabolisme in de mens gemeten worden. Op deze manier kan de ontwikkeling van stoffen met een ongunstig metabolisme in de mens al in vroeg stadium gestopt worden op het moment dat er nog geen of heel weinig dieren zijn gebruikt. Naast vervanging en vermindering van dierproeven kan microdosing ook een rol spelen bij verfijning van dierproeven. Namelijk op basis van het humane metabolisme profiel kan de keuze voor het meest geschikte proefdier voor vervolgstudies worden gemaakt. *Microdosing* wordt in internationale richtlijnen genoemd als mogelijkheid voor niet-klinisch onderzoek.

7.2 Toepassingsdomein

Bij de ontwikkeling van nieuwe methoden zal een optimale balans gevonden moeten worden tussen de specificiteit en de sensitiviteit om een goede voorspellende waarde voor de mens te kunnen genereren. Het is belangrijk vast te stellen waarvoor men een alternatieve methode wil gebruiken. Het doel van een proef bepaalt welke eisen gesteld moeten worden aan een alternatieve methode. Door dit nadrukkelijk van te voren vast te stellen, kunnen alternatieven efficiënter worden ingezet. Alternatieven kunnen voor uiteenlopende doelen worden toegepast:

- *Hazard identification*: beoordelen van potentie om schadelijke effecten te veroorzaken.
- Mechanistisch/exploratief onderzoek om werkingsmechanismen te identificeren.
- Registratie van stoffen: wettelijk verplichte studies.
- Prioritering: selectie van stoffen die hoge prioriteit moeten krijgen

- voor de beoordeling van hun veiligheid voor mens en milieu.
- *Pre-screening* van stoffen welke het meest dan wel het minst geschikt lijken om verder te ontwikkelen.
 - *Risk assessment*: bijvoorbeeld voor het vaststellen van drempelwaarden of '*no observed adverse effect levels*' (NOAEL).
 - *Confirmation testing*: eenvoudige (in vitro) test om resultaten verkregen door '*non testing*' methoden te bevestigen.

Een alternatief model valideren voor alle mogelijke (bestaande en nieuwe) chemicaliën is een zeer tijdrovende zaak. Het goed definiëren van het chemisch domein kan de voorspellende waarde verbeteren en daarmee de toepassing versnellen. Indien een producent bijvoorbeeld kan aantonen dat een methode een goede voorspelling oplevert voor een bepaalde groep stoffen, die wat betreft chemisch structuur verwant zijn, of therapeutisch gezien eenzelfde werking hebben, zal dit door de autoriteiten sneller geaccepteerd worden. Het is beter om bepaalde groepen van stoffen uit te sluiten voor een test, in plaats van de methode te optimaliseren voor een heel breed scala aan chemische stoffen. Hoewel er naar verwachting steeds betere modellen zullen komen, die een betere voorspelling opleveren en dus relevanter zijn voor de mens, zal een besluit op basis van een enkele alternatieve methode niet snel worden genomen. Ook kan het zijn dat individuele testen niet voldoende (betrouwbare) informatie opleveren voor de veiligheidsbeoordeling. De combinatie van testen kan juist wel voldoende zekerheid opleveren zodat op basis van een '*weight of evidence*' een conclusie kan worden getrokken met betrekking tot de positieve dan wel negatieve effecten van een stof.

7.3 Voorkomen is beter dan vervangen

De beste manier om dierproeven te verminderen, te verfijnen dan wel te vervangen is natuurlijk het voorkómen. Kunnen we de veiligheid van stoffen garanderen zonder te testen? Onder zogenaamde '*non-testing*' methoden verstaan we methoden waarbij gegevens van stoffen worden verkregen zonder daarbij gebruik te maken van een dier- dan wel een celkweek experiment.

Voorbeeld hiervan is dat op basis van structuuractiviteit relaties (SARs) voorspellingen worden gedaan over de mogelijke toxiciteit van stoffen. SAR modellen zijn computer programma's op basis van wiskundige modellen (algoritmen) waarmee op basis van de structuur van de stof of fysisch-chemische parameters de effecten van een stof kan worden voorspeld. Deze computer modellen kunnen gebruikt worden mits er sprake is van een goed gedefinieerd toxicologisch effect, een duidelijk algoritme, een gedefinieerd chemisch domein en bijvoorkeur de resultaten geïnterpreteerd kunnen worden op basis van het werkingsmechanisme²¹. Natuurlijk geldt ook hier dat om deze algoritmen te ontwikkelen de beschikbaarheid van goede dierexperimentele gegevens cruciaal is.

Andere '*non-testing*' methoden zijn '*chemical categorizing*' en '*read across*'. Deze methodieken worden gebruikt om stoffen op basis van chemische structuur verwantschap, reactiviteit en metabolisme in categorieën in te delen en vervolgens toxiciteit-gegevens onderling met elkaar te vergelijken. Mogelijke ontbrekende gegevens kunnen worden geëxtrapoleerd op basis van resultaten verkregen met verwante stoffen in dezelfde categorie. Eventueel kunnen met behulp van eenvoudige *in vitro* testen de geëxtrapoleerde resultaten worden geverifieerd (*confirmation testing*). Dit soort methodieken worden nu met succes toegepast, in het OECD programma voor bestaande stoffen en door de *Food and Drug Administration* (FDA) toegepast voor de beoordeling van medicijnen en voedingsingrediënten. Het aantal dierproeven kan hiermee aanzienlijk worden gereduceerd. Dit is binnen Europa ook de uitdaging voor REACH²². Niet onbelangrijk is het delen van dierexperiment gegevens (*data sharing*). Veel gegevens zijn beschikbaar bij het bedrijfsleven maar niet openbaar beschikbaar. Overheden moeten bedrijven blijven stimuleren hun data met elkaar te delen om te voorkomen dat dierexperimenten onnodig herhaald worden.

7.4 Van identificatie van gevaren, naar inschatting van risico's
Bij een geïntegreerde risicobeoordeling is niet de schadelijke

potentie van een stof leidend, maar de effecten van een stof op de mens in combinatie met een mogelijke blootstelling. In tegenstelling tot het sequentieel testen dat tot op heden meestal wordt toegepast, zal een veiligheidsbeoordeling op basis van alle beschikbare gegevens moeten plaats vinden, inclusief gegevens met betrekking tot blootstelling en metabolisme. Hiermee kan voorkomen worden dat er dierproeven worden uitgevoerd die niet noodzakelijk zijn omdat er geen blootstelling is, of omdat het mechanisme in de mens niet relevant blijkt te zijn. Als er geen sprake is van bedoelde blootstelling, of als er sprake is van een zeer lage blootstelling, kan men zich afvragen hoe relevant het is om een volledig toxiciteitsprofiel vast te stellen. Een van de aspecten die bij de risicobeoordeling van belang is, is of deze toxische effecten ook optreden bij een relevante concentratie en blootstellingroute in de mens. Farmacokinetische modellen zijn computer modellen die het effect van metabolisme en de kinetiek van een stof kunnen voorspellen, en op die manier een schatting kunnen maken van de interne blootstelling. Deze *in silico* modellen kunnen worden gebruikt bij de extrapolatie van *in vitro* gegevens naar *in vivo* data. In een *in vitro* reprotoxiciteit test¹ wordt onderzocht of een stof embryotoxisch is. De zogenaamde EC50 die gemeten wordt in deze test wordt gebruikt om met behulp van *in silico* modellering de toxische concentratie *in vivo* te kunnen voorspellen²³. TNO onderzoekt in een samenwerkingproject met het IRAS, RIVM en WUR of deze aanpak ook generiek geldt voor andere schadelijke effecten zoals bijvoorbeeld carcinogeniteit. Als we in staat zijn *in vitro* data te extrapoleren naar effectconcentraties *in vivo* kunnen we mogelijk het aantal dierexperimenten verder verminderen.

7.5 Nieuwe technologieën en producten, kansen voor alternatieve benaderingen

De laatste jaren zijn producten op de markt verschenen, van een ander karakter dan de gebruikelijke chemicaliën. Voorbeelden hiervan zijn nanomaterialen, 'biologicals' en zogenaamde 'natural products'. Om verschillende redenen is het de vraag of deze

¹ de embryonale stamcel test (EST) is een methode om de effecten van stoffen op de ontwikkeling van embryo's te bestuderen. Hierbij worden muizen stamcellen gedifferentieerd tot kloppende hartcellen. De concentratie waarbij de differentiatie van 50% van hartcellen geremd is, wordt de EC50 genoemd

producten met behulp van huidige beschikbare diermodellen en teststrategieën getest kunnen worden. Nanotechnologie is de techniek die gebruik maakt van deeltjes in de orde grootte van enkele nanometers (<100nm). Deze deeltjes bieden technologisch gezien zeer veel mogelijkheden en worden gebruikt in industriële materialen, als 'drug delivery' systeem (om medicijnen op plaatsen te krijgen waar ze normaal gesproken niet of moeilijk kunnen komen) of in de voeding. Door de steeds bredere toepassing zijn ook vragen ten aanzien van de veiligheid gesteld. Hoe wordt de mens blootgesteld aan nanodeeltjes en hoe gedragen deze deeltjes zich in het lichaam? Zijn er mogelijk vergelijkbare effecten als bij asbest te verwachten? Er is nog onzekerheid of deeltjes toxisch(er) zijn vanwege de grootte en dus als nano deeltje getest moeten worden, of dat de samenstelling van het deeltje het meest belangrijke is voor de mate van toxiciteit.

Biologicals zijn geneesmiddelen die bestaan uit natuurlijke eiwitten zoals antilichamen, cytokines, eiwitten of synthetische peptiden en zeer specifiek werkzaam zijn in de mens. Zoals eerder door Raymond Pieters is aangegeven, zijn de bestaande diermodellen veelal niet geschikt om de effectiviteit en veiligheid van deze *biologicals* te testen. Er zullen nieuwe *in vitro* modellen, of *in vivo* modellen ontwikkeld moeten worden die relevanter zijn voor de mens, om deze stoffen te kunnen beoordelen wat betreft hun effectiviteit en veiligheid.

Daarnaast zien we een toenemende trend voor het gebruik van natuurlijke producten, bijvoorbeeld stoffen die geëxtraheerd worden uit planten en kruiden (*phytochemicals*). Dit zijn meestal mengsels bestaande uit bekende en onbekende stoffen, waar we vaak al eerder aan blootgesteld zijn geweest. De vraag is of eventuele positieve dan wel nadelige effecten het beste in een diermodel gemeten kunnen worden. Voor al deze nieuwe ontwikkelingen geldt dat de toepassing van alternatieve testen vanuit wetenschappelijk oogpunt gewenst is, maar ook zijn er binnen de regelgevende kaders nog mogelijkheden. Interessant is ook te zien of trends in de ontwikkeling van geneesmiddelen zich ook zullen voordoen bij voedingsingrediënten met een

gezondheidsclaim. Bijvoorbeeld om tijdens de fase waarin gekeken wordt naar de werkzaamheid van een stof ook al veiligheidsaspecten te onderzoeken. De grenzen tussen werkzaamheid en veiligheidstesten zullen vervagen. Het lectoraat *Innovative Testing* zal zich gaan richten op de ontwikkeling van nieuwe methoden waarbij in een vroeg stadium zowel positieve als negatieve effecten gemeten kunnen worden.

Kort samengevat zou er meer flexibiliteit moeten komen ten aanzien van de inzet van nieuwe methoden bij verschillende vraagstellingen en technologieën. Daar waar een model zijn waarde heeft aangetoond, dus onderbouwd is met wetenschappelijke argumenten, zou deze gebruikt moeten kunnen worden in innovatieve teststrategieën. Voorwaarde is wel dat er van deze nieuwe methoden ook '*post-approval surveillances*' worden bij gehouden. Gevalideerde methoden moeten kritisch worden gevolgd en indien na verloop van tijd blijkt dat de methoden toch niet de gewenste gevoeligheid en betrouwbaarheid vertonen, moeten de methoden aangepast worden. Als dit niet lukt verliezen ze hun 'wetenschappelijke validiteit en daarmee ook hun toepasbaarheid.

“INNOVATIEF TESTEN BETEKENT GRENZEN VERLEGGEN, WAARBIJ DE MENS CENTRAAL STAAT”

pag
107

hoofdstuk 8
Waar gaan we naar
toe? Innovatief testen
hoe doe je dat?

lectoraat
Innovative Testing
in Life Sciences &
Chemistry

onderwerp
Innovative Testing
Grenzen verleggen &
bruggen bouwen

8 / WAAR GAAN WE NAAR TOE? INNOVATIEF TESTEN HOE DOE JE DAT?

Zoals in het voorgaande hoofdstuk is aangegeven, is op de korte termijn zeker nog winst te behalen in het reduceren van het aantal dierproeven met technisch betere en bijvoorkeur humane modellen (relevanter voor de mens) en non-testing methoden. Voorwaarde is wel dat we bereid zijn onze grenzen van de huidige test methodieken te verleggen.

Als we echter op de langere termijn het proefdiergebruik verder willen terugdringen zullen we gebruik moeten maken van andere technieken en bruggen moeten bouwen naar andere vakgebieden. Met betrekking tot verfijning en vermindering van proefdieren zullen nieuwe technologische innovaties zoals imaging en -omics, een grote vlucht nemen. **Innovatief testen hoe doe je dat nu eigenlijk?**

8.1 Imaging technieken

Moleculaire beeldvorming (*imaging*) is een snel groeiende discipline die de detectie van nieuwe (marker)moleculen combineert met geavanceerde afbeeldingstechnieken. *Imaging* technieken maken gebruik van radioactieve straling (PET, SPECT), van magnetische gevoeligheid van protonen in water moleculen (MRI) of ultrageluid (echografie). Op deze manier kunnen beelden worden verkregen van specifieke moleculaire processen in het lichaam, in het bijzonder die betrokken zijn bij ziekte-, (ab)normale ontwikkeling- en verouderingsprocessen. Het veld van moleculaire beeldvorming heeft recent een vlucht genomen dankzij doorbraken in moleculaire- en celbiologische technieken. De afgelopen jaren is de resolutie bij de afbeeldingstechnieken voor kleine scan volumina (bijvoorbeeld micro-PET en micro-SPECT) zodanig verbeterd dat deze techniek succesvol gebruikt kan worden bij kleine proefdieren. Het grote voordeel van *imaging* is dat in de tijd dieren kunnen worden gevolgd bijvoorbeeld in de ontwikkeling van de hersenen. Imaging apparatuur kan ingezet worden voor preklinisch proefdierkundig en toxicologisch onderzoek en zal

mettertijd een groot deel van bijvoorbeeld het gedragsonderzoek en het (neuro)pathologische onderzoek kunnen vervangen. Imaging technieken kunnen ook worden gebruikt om specifiek de activiteit van genen te meten door middel van luminescentie²⁴. Deze reporter-gen technieken worden zowel in proefdieren als ook in humane cellijnen toegepast. Het zal ook kunnen leiden tot nieuwe mogelijkheden voor translationeel onderzoek. Deze technieken worden immers al geruime tijd toegepast in de mens (patiënt). Algemeen is de verwachting gerechtvaardigd dat wanneer proefdier imaging apparatuur toegankelijker wordt, er ook meer gebruik van zal worden gemaakt door academie en industrie, maar ook bijvoorbeeld door veterinaire klinieken en (pluim)vee-houderijen. Ook binnen het Bioplaza Utrecht (waarin HU, UU en TNO zijn vertegenwoordigd) is veel aandacht voor het thema innovatie in life sciences. Hierbij gaat het om de mogelijkheid te bieden om van gezamenlijke faciliteiten gebruik te maken. Naast gezamenlijke huisvesting, labruimten en dierfaciliteiten, moet men ook denken aan het delen van imaging faciliteiten en weefselbanken. Faciliteiten die voor een brede toepassing bedoeld zijn, zoals hierboven geschetst, kunnen dus ook een rol spelen bij verdere innovatie in de zoektocht naar alternatieven voor dierproeven.

8.2 Meten van cellulaire fysiologie met behulp van -omics technologieën

Begin van deze eeuw heeft de - omics technologie op grote schaal zijn intrede gedaan. Deze technologieën zijn gebaseerd op de analyse van een zeer groot aantal genen tegelijkertijd. Hierbij kun je denken aan analyse van mRNA (transcriptomics), eiwitten (proteomics) en metabolieten (metabolomics). Toxicogenomics is de wetenschap die zich bezig houdt met het meten van veranderende genexpressie in cellen, weefsel en organismen in reactie op blootstelling aan toxische stoffen. Hierbij wordt de grote uitdaging de interpretatie van de enorme hoeveelheden data met behulp van bioinformatica.

Deze technologie zal in eerste instantie bijdragen aan verfijning en vermindering van dierproeven, bijvoorbeeld met betrekking

tot de keuze van de diersoort, het aantal dieren per groep en het feit dat er meer gegevens per dier kunnen worden gegenereerd. *In vivo* dierexperimenten zullen niet meer uitgevoerd worden om effecten op specifieke eindpunten te meten, maar met als doel het ontrafelen van werkingsmechanismen en het identificeren van nieuwe toxicologische pathways. Dit concept is ook voorgesteld in het eerder genoemde visiedocument '*Toxicity testing in the 21st Century*'¹¹. Voorgesteld wordt gebruik te maken van de recente vooruitgang op het gebied van de moleculaire biologie, bioinformatica en snelle (*high-through put*) testen om meer inzicht te krijgen in de belangrijkste cellulaire processen en biologische routes, ook wel '*pathways*' genoemd. De processen, die dusdanig worden verstoord door blootstelling aan stoffen dat ze tot een gezondheidsrisico kunnen leiden, worden toxicologische pathways genoemd. Of pathways daadwerkelijk worden verstoord, hangt af van de mate van blootstelling (dosis effect relaties). Hierin worden bij voorkeur humane blootstellinggegevens meegenomen. Nieuwe inzichten in de werkingsmechanismen van stoffen zullen moeten leiden tot de ontwikkeling van methoden, waarbij effecten die plaats vinden op toxicologische pathways in eenvoudige en doelgerichte *in vitro* systemen gemeten kunnen worden. Bij voorkeur met humane cellen, eventueel aangevuld met beperkte diergegevens. In tegenstelling tot de huidige teststrategie zullen niet alle schadelijke effecten gemeten worden. Alleen de effecten die bijdragen aan de besluitvorming betreffende de te nemen veiligheidsmaatregel(en) worden gemeten.

Het eerder genoemde ASAT programma staat voor een nieuwe benadering van veiligheidsbeoordeling van voeding, medicijnen, chemicaliën en cosmetica met als doel de volksgezondheid beter te beschermen. Hierbij wordt gestreefd naar stap voor stap vervangen van dierproeven. Uitgangspunten zijn aanvaardbare risico's voor mens en milieu, welke van te voren geïdentificeerd zijn en daarbij horende onzekerheden expliciet zijn gemaakt. Hierbij wordt gekeken naar een beperkt aantal gezondheidsrisico's welke men wil voorkomen. Nieuwe methoden worden mogelijk door integratie van -omics technologieën, maar ook bioinformatica, statistiek,

epidemiologie en klinische geneeskunde. Mogelijk zullen -omics technologieën in combinatie met *in vitro* humane modellen op lange termijn dierproeven kunnen vervangen. De eerlijkheid gebied te zeggen dat tot nu toe deze technologische innovatie nog niet tot echte doorbraken heeft geleid op het gebied van alternatieven voor dierproeven. De kostbare technologie is wel succesvol gebruikt in de diagnostiek en heeft tot meer inzicht geleid in het ontstaan van ziekten zoals kanker²⁵.

8.3. Grenzen verleggen en bruggen bouwen

Als we het biomedisch onderzoek niet willen stopzetten, zullen we voorlopig het gebruik van proefdieren moeten accepteren. Maar waar moet de meeste investering plaatsvinden om het proefdiergebruik verder te kunnen reduceren? Op korte en midden lange termijn is de meeste winst te behalen in verfijning en vermindering van proefdieren. Of op de lange termijn volledige vervanging mogelijk is, hangt van veel factoren af. Zoals geschetst zijn er technische, wetenschappelijke, morele, politieke en economische factoren. Vast staat dat het een gezamenlijke inspanning van academie (uit de verschillende disciplines en vakgebieden), bedrijfsleven, overheden en maatschappelijke organisaties moet zijn, waarin iedereen zijn eigen verantwoordelijkheid neemt, gericht op het vinden van oplossingen. De tijden van segregatie zijn voorbij en gebleken is dat wetgeving alleen (een verbod op dierproeven) niet voldoende is. Meer regels en wetten is niet de oplossing. Innovatief testen betekent grenzen verleggen, waarbij de mens centraal staat. De huidige teststrategieën zullen verbeterd worden, gebruik makend van methoden die niet per definitie ontwikkeld zijn als alternatief voor dierproeven. Als we in staat zijn bruggen te bouwen, ook buiten ons eigen vakgebied, kunnen we met nieuwe inzichten elders verworven vermindering van dierproeven bewerkstelligen. Veilig en Verantwoord Vernieuwen is zeker mogelijk.

Laten we gebruik maken van nieuwe ontwikkelingen, maar ook realistisch, eerlijk en transparant zijn naar alle betrokkenen: consumenten, patiënten, wetenschappers, beleidsmakers en het bedrijfsleven. Mensen worden teleurgesteld en verliezen het vertrouwen in nieuwe manieren van testen, als we geen realistische doelen stellen en beloftes niet kunnen waar maken. Terwijl vertrouwen van alle partijen is juist datgene wat we willen opbouwen en wat we nodig hebben om een verandering in 'mind set' te realiseren.

"CHANGING MINDS GAAT NIET VANZELF"

pag
113

hoofdstuk 9
'Changing minds';
educatie van nieuwe
geesten voor alter-
natieven

lectoraat
Innovative Testing
in Life Sciences &
Chemistry

onderwerp
Innovative Testing
Grenzen verleggen &
bruggen bouwen

9 / 'CHANGING MINDS'; EDUCATIE VAN NIEUWE GEESTEN VOOR ALTERNATIEVEN

Het mag duidelijk zijn dat het geen makkelijke opgave is om het aantal dierproeven te verminderen of zelfs helemaal geen proefdieren meer te gebruiken. Het betekent dat wij, en daarmee bedoel ik wetenschappers, studenten, producten, overheden, maar ook iedereen die deel uitmaakt van de maatschappij, op een andere manier naar veiligheid, medische vooruitgang en dierproeven moeten gaan kijken. Een ieder van ons zal, vanuit verschillende perspectieven bezien, de stelling onderschrijven dat we liever geen dierproeven doen. Maar als we echt een doorbraak willen bewerkstelligen dan zijn er mensen nodig die op een andere manier de waarde van dierproeven en de alternatieven gaan beoordelen. 'Changing minds' is daarom de titel van het laatste deel van deze openbare les.

De huidige wetgeving komt voort uit het streven naar optimale veiligheid van de mens en haar omgeving. Van oudsher lag de verantwoordelijkheid voor de bescherming van de consument, werknemer en patiënt bij de overheid. Door de technologische vooruitgangen is er steeds meer mogelijk geworden en daarmee wordt ook het streven naar een 100% veilige omgeving versterkt. Helaas moeten we vaststellen dat een 100% veilige omgeving niet realistisch is en de vraag blijft hoeveel veiliger onze wereld nog kan worden. In plaats van het streven naar meer zekerheid, is het beter te leren omgaan met onzekerheid. Onze zekerheden zijn niet absoluut, maar omkleed met onzekerheid. Als we de onzekerheidsfactoren kunnen reduceren is daar in vele opzichten winst te behalen. Winst voor mensen, ondernemingen en proefdieren.

Met een terugtrekkende overheid, zoals de laatste jaren is ingezet zal er een verschuiving van de verantwoordelijkheid voor de veiligheid van producten gaan plaatsvinden in de richting van de

producenten (zoals ook met de invoering van REACH is beoogd). Consumenten zullen ten aanzien van het bedrijfsleven net zoveel vertrouwen moeten krijgen als dat men nu heeft in de overheid. Hoewel de experts in de toekomst mogelijk op een andere manier potentiële risico's inschatten, is het belangrijk ons te realiseren dat zowel de overheid als de producent nooit 100% veiligheid zullen claimen. Het beste dat men kan doen, is op basis van alle beschikbare gegevens een schatting maken van het mogelijke risico. Bijvoorbeeld een schatting maken van de kans dat een bepaalde stof zal leiden tot kanker in 1 op 1.000.000 mensen. Het is aan een individu zelf te bepalen of men dit een aanvaardbaar risico vindt. Daarnaast is het de verantwoordelijkheid van de overheid en de producenten de juiste onafhankelijke informatie over het gebruik van dierproeven te leveren die nodig is bij het maken van een inschatting van deze risico's. Openheid en transparantie bevorderden het vertrouwen van de consument.

'*Changing minds*' gaat niet vanzelf. Hoe kunnen we dit bewerkstellingen? Wat betekent dit voor ons wetenschappers, de experts en toekomstige wetenschappers, de studenten? Het vraagt een kritische kijk naar de waarde die we hechten aan proefdiergegevens, het vraagt breken met tradities (niet vanuit historisch perspectief voor het proefdier kiezen), vertrouwen krijgen in het 'onbekende'. Voor nieuwkomers in het vak betekent dit dat men vragen stelt over het waarom en hoe dierproeven worden uitgevoerd en proactief keuzes maakt in relatie tot alternatieve methoden. Overigens zou het onderzoek naar alternatieven ook aantrekkelijker gemaakt moeten worden om goede wetenschappers te behouden. Om een voorbeeld te geven, op dit moment is er voor topwetenschappers weinig eer te behalen in dit vakgebied, wetenschappelijke tijdschriften hebben beperkte impact factors en de geringe subsidiemogelijkheden zorgen er voor dat slechts tijdelijke aanstellingen mogelijk zijn. Ook voor het bedrijfsleven ligt er een belangrijke taak invulling te geven aan de zogenaamde 4^{de} V van Verantwoordelijkheid (*Responsibility*). Verantwoordelijkheid voor het (stimuleren van) ontwikkelingen van alternatieve methoden. Tot nu toe heeft de

industrie de ontwikkeling van alternatieve methoden gestimuleerd door zelf nieuwe modellen te ontwikkelen en actief bij te dragen aan EU projecten en validatie studies. Aan de andere kant wordt ook, om begrijpelijke redenen, nog regelmatig gekozen voor de 'weg van de minste weerstand' en de klassieke testen aangeleverd bij de overheden. Gelukkig zien we ook veranderingen en zijn bijvoorbeeld recentelijk met succes bij de Amerikaanse overheid door de industrie genomics data ingediend van een stof waarmee een langdurige carcinogeniteitstudie met ratten voor een chemische stof is voorkomen. Vanuit economisch perspectief is het interessant te bezien wat er in tijden van recessie gebeurt. Laten we hopen dat dit niet betekent dat het bedrijfsleven teruggrijpt naar korte termijn oplossingen en oude tradities. Ook verandering van denken bij overheden en maatschappelijke organisaties door de bereidheid van producenten om de dialoog aan te gaan. Om uit te leggen waarom men met behulp van alternatieve methoden, met minder of geen dierproeven voldoende informatie kan verkrijgen om de werkzaamheid en veiligheid van een product te beoordelen. De dialoog met overheden op zoeken en de toepasbaarheid van alternatieven voor specifieke doeleinden aan tonen, in plaats van wachten op formeel gevalideerde en geaccepteerde alternatieven. Mijn ervaring vanuit TNO leert dat overheden hier voor open staan, mits goed onderbouwd met wetenschappelijke argumenten. Maar de eerlijkheid gebied me te zeggen dat dit geduld en doorzetting vereist. Voor overheden (*regulators*) is het belangrijk dat zij continue betrokken zijn bij ontwikkeling van nieuwe methoden en teststrategieën, veel meer dan in het verleden. Als dit in een vroeg stadium gebeurt, kan men aangeven wat belangrijk is voor de acceptatie van nieuwe methoden. De implementatie van een alternatieve methode moet geen sequentieel proces zijn, eerst ontwikkeling, daarna validatie, acceptatie en implementatie, maar een geïntegreerd proces waarbij van het begin alle partijen betrokken zijn.

Betekent dit dat we als consument ons zorgen moeten gaan maken over de veiligheid van onze medicijnen, ons voedsel of de chemicaliën waarmee we werken? Nee, de veiligheidseisen voor ons voedsel zullen niet aangepast worden en ook medicijnen zullen uitvoerig getest worden voor ze op de markt komen. Zoals in de voorgaande hoofdstukken is geschetst, zullen alleen andere mogelijkheden worden toegepast om veilig en verantwoord te vernieuwen. Het wordt een uitdaging de vele factoren die een rol spelen bij dit complexe vraagstuk in de goede richting te leiden.

Veranderingen in denken vinden niet vanzelf plaats. Of zoals de Engelse econoom John Maynard Keynes treffend schreef: *'The difficulty lies not so much in developing of new ideas, but in escaping from the old ones'*. Daarin moeten we dus mensen gaan opleiden. Educatie is hierbij de sleutel en een centraal thema binnen ons lectoraat. Educatie komt uit het Latijn: *educere* en betekent bekendmaken en wordt omschreven als leerprocessen (onderwijzen en leren) binnen én buiten de schoolse omgeving. Gelukkig staan we niet alleen voor deze uitdagende taak. In de regio Utrecht is vanouds her veel aandacht voor alternatieven. Door onze buitenlandse collega's worden we geprezen om het vele werk dat we al hebben verricht, met een kleine doch zeer gemotiveerde groep. Het kenniscentrum wil graag nauw samenwerken met verschillende partners in de regio zoals het Nationaal (Kennis) Centrum Alternatieven voor Dierproeven op het gebied van alternatieven in het onderwijs. Prof. Dr. Coenraad Hendriksen, hoogleraar Alternatieven voor Dierproeven aan de Universiteit Utrecht verzorgt een deel van het onderwijs en het kenniscentrum helpt in opdracht van het Nederlands Vaccin Instituut (NVI) bij de ontwikkeling van een *in vitro* methode om vaccins te kunnen testen. Recentelijk zijn er nog een tweetal hoogleraren benoemd Prof. Dr. Bas Blaauboer 'Alternatieven voor dierproeven in de toxicologische risicobeoordeling' (IRAS-UU) en TNO collega Prof. Dr. Ruud Woutersen in Wageningen als hoogleraar Translationele Toxicologie. Het is duidelijk dat er veel aandacht is voor alternatieve methoden. Dit biedt de mogelijkheid om in de komende jaren een flinke stap vooruit te maken!

Hoe gaan we met het lectoraat Innovative Testing bijdragen aan een veranderende geest? Het *Institute for Life Science & Chemistry* heeft als primaire doel studenten opleiden tot goede onderzoeksanalisten moleculaire biologie, dierkunde, microbiologie, analytische- en organische chemie, en chemische technologie, waarvan kennis en praktische vaardigheden goed aansluiten bij de behoefte van bedrijfsleven en onderzoeksinstituten.

Het lectoraat zal zich gaan richten op de ontwikkeling en validatie van *in vitro* methoden om op efficiënte wijze de werkzaamheid en veiligheid van nieuwe stoffen te kunnen meten. In eerste instantie wil het lectoraat zich gaan richten op natuurlijke producten afkomstig van planten en kruiden (*phytochemicals*) en de effecten van deze stoffen op oxidatieve stress, genetische schade en immuunmodulatie. Naast een bijdrage aan het theorieonderwijs zal in het kenniscentrum gedurende het hele curriculum onderzoek worden uitgevoerd in de vorm van practica en projecten, in het bijzonder tijdens de minoren *Innovative Strategies as Alternatives to Animal Testing* en *Drug Design*. Deze onderzoeksprojecten worden uitgevoerd met docent-onderzoekers en studenten. Studenten zullen op deze manier kennis maken met nieuwe technologieën en bewust worden van keuzes ten aanzien van alternatieve methoden. We streven er naar studenten en docenten op te leiden met een open houding naar innovatie op het gebied van dierproeven en alternatieven, zonder daarbij de complexiteit van dit domein uit het oog te verliezen. Hierbij blijft verantwoord en veilig vernieuwen centraal staan. We willen zeker geen 'anti-dierproeven' houding creëren. Maar een kritische houding in relatie tot dierexperimenten, met een open blik naar andere mogelijkheden, studenten die zich vaker de vraag stellen: 'Kan het ook anders?'

Het is de bedoeling dat onderzoek zoveel mogelijk wordt uitgevoerd in samenwerking met het bedrijfsleven en kennisinstellingen. Waarbij het lectoraat zich zal richten op het innovatieve MKB, voornamelijk startende ondernemers in Life Sciences onderzoek. Het kenniscentrum wil ondernemers helpen te zoeken naar innovatieve oplossingen en kosteneffectieve test

methoden gericht op de ontwikkeling van nieuwe producten, waarbij zo min mogelijk dierproeven hoeven worden gedaan. Ondernemingen zullen op deze manier bekend raken met nieuwe technologieën en teststrategieën. Dit sluit heel goed aan bij de doelstellingen van TNO, waarmee we dan ook nauw zullen gaan samenwerken. Hopelijk kan Hogeschool Utrecht op deze manier voor het MKB een toegangspoort zijn naar TNO.

Recentelijk heeft de Nederlandse organisatie voor gezondheidsonderzoek en zorginnovatie (ZonMw) een project gehonoreerd waarin Hogeschool Utrecht in samenwerking met IRAS, TNO, RIVM, ECVAM en de Universiteit van Milaan een alternatieve methode gaat valideren om de immuuntoxiciteit van stoffen te testen. Dit sluit goed aan bij de doelstellingen die we hebben en is een prachtige kans de komende 1,5 jaar het kenniscentrum (inter)nationaal op de kaart te zetten op het gebied van alternatieven voor dierproeven.

De rol van opleider in bredere zin willen we ook vorm gaan geven door het organiseren van een *summerschools*. Door een tweetal Europese projecten zijn we gevraagd een cursus te organiseren die zowel theoretisch als ook praktisch onderwijst over nieuwe alternatieve methoden die zijn ontwikkeld binnen EU projecten (*Sens-it-iv* en *Carcinogenomics*). Op deze manier willen we onze kennis en vaardigheden inzetten om ook internationaal bij te dragen aan de noodzakelijke verandering in '*mind set*'.

Daarnaast is een belangrijke factor de maatschappij waar we allemaal deel van uit maken. Te vaak zien we nog dat mensen niet goed geïnformeerd zijn over het nut en de noodzaak van dierproeven en alternatieven. Begin 2007 werd op de HU als afsluiting van de minor een discussieochtend georganiseerd, waarbij studenten en aanwezige belangstellenden met dierenwelzijnorganisaties en academici hebben gediscussieerd over de (on)mogelijkheden van dierproeven en alternatieven. Hierdoor worden studenten ook vaardigheden bij gebracht zoals ethische discussies en debatteren met relatieve buitenstaanders. Hogeschool Utrecht wil graag een open dialoog en heldere communicatie stimuleren.

De activiteiten van het lectoraat sluiten zeer goed aan bij de koers die Hogeschool Utrecht is ingeslagen. Ik noem een aantal kernwoorden uit het strategische document Koers 2012: internationalisering, diversiteit, innovatie in onderwijs, professionalisering, samenwerking met Universiteit Utrecht en kennisinstellingen. Ik hoop dat ik u duidelijk heb kunnen gemaakt wat ons bijdrage hieraan kan zijn.

Persoonlijk ben ik er van overtuigd dat we met het kenniscentrum van Hogeschool Utrecht een bijdrage kunnen leveren aan de veranderende '*mind set*' in onze 'wereld'. Wij kunnen en willen dit uiteraard niet zonder de samenwerking met onze partners IRAS en TNO. Er staan een paar mooie uitdagingen op ons te wachten. Ik hoop dat ik u heb laten zien dat veilig en verantwoord vernieuwen met zo min mogelijk proefdieren een grote uitdaging is die wij graag aan gaan. Hieruit spreekt ambitie, maar die heb je nodig om iets te bereiken. Ik spreek u graag over 4 jaar weer!

Utrecht, 29 januari 2009

BIJLAGEN

DANKWOORD	121
CURRICULUM VITAE	123
REFERENTIELIJST	124

/ DANKWOORD

Tot slot wil ik graag mijn dank uitspreken aan iedereen die betrokken is bij dit lectoraat.

Allereerst de directie van TNO die mij in de gelegenheid heeft gesteld dit lectoraat te vervullen. Maar ook de collega's van TNO, in het bijzonder het Genetische & In Vitro Toxicologie team, die mij voor een dag per week 'afstaan' aan de Hogeschool Utrecht. De activiteiten van TNO en HU sluiten prima bij elkaar aan en ik hoop dat ik dit lectoraat tot een vruchtbare samenwerking zal leiden. Daarnaast wil ik natuurlijk het college van bestuur van Hogeschool Utrecht en de directie van de Faculteit Natuur en Techniek bedanken voor het vertrouwen dat ze in mij hebben uitgesproken om deze klus op te pakken. Hierbij ben ik vanaf het begin enorm gesteund door het management en de docenten van het Instituut voor Life Sciences & Chemistry. Ik bewonder jullie inzet voor de studenten!

De leden van het kenniscentrum: Marc, Saertje, Johanna, Robert Jan en Tineke zorgen voor veel energie. Dank voor jullie enthousiasme en de dynamiek waarmee jullie helpen het kenniscentrum echt vorm te geven. Het is elke vrijdag weer een groot genoegen naar het ILC te mogen gaan.

In het bijzonder wil ik de coördinator van het kenniscentrum Marc Teunis bedanken. Als jij niet in 2005 naar TNO was gekomen, had ik hier niet gestaan. Ik heb het enorm gewaardeerd dat je vakantiedagen en avonden opofferde om met mij in 'het torentje' een nieuw stuk onderwijs op te zetten. Ze verklaarden ons voor gek, maar ik heb het met plezier gedaan. Ook je inzet voor de oprichting van het kenniscentrum was enorm en hoewel we af en toe wat hobbels hebben te nemen, de aanhouder wint zoals je ziet! Ik hoop nog lang met je te mogen samenwerken.

Graag wil ik mijn collega lector Raymond Pieters bijzonder bedanken. Zoals onlangs twee collega lectoren zeiden: 'ons co-lectorat lijkt wel een geëngageerd huwelijk dat slechter had kunnen aflopen'. Gelukkig had ik in dit huwelijk een flinke vinger

in de pap. Ik ben ontzettend blij dat je me belde en dat je naar de Hogeschool bent gekomen. De energie waarmee jij dit pionierswerk hebt opgepakt is voor mijn een enorme stimulans. We houden elkaar scherp, daar houd ik van. Maar we hebben, zowel binnen als buiten werktijden, ook veel plezier. De juiste ingrediënten om de uitdagingen waarvoor we staan tot een succes te brengen.

Ik zou graag nog twee mensen in het bijzonder willen noemen. Allereerst mijn TNO partner in crime Marie-José Steenwinkel. De uitdagingen waar we bij TNO voor staan, zijn zeker niet minder groot. Maar tijdens de nodige korte en lange gesprekken vinden we altijd weer nieuwe energie. Dank voor de ruimte die je me geeft. Ten tweede Han van de Sandt. Vanaf het begin heb je mij gesteund in deze uitdaging. Dank voor de goede gesprekken, de spiegel die je me voor houdt en je altijd luisterend oor. Het is inspirerend met je te sparren over een onderwerp dat onze beiden zo enorm boeit.

En dan niet te vergeten mijn vrienden en vriendinnen die me altijd met veel interesse hebben gevolgd en voor de nodige ontspanning zorgen. Het is heerlijk om te relativeren onder het genot van een goed glas wijn, en grote pot thee op het wad, in de kroeg, tijdens het spinnen, in de bergen of in Benin. Ik mag me gelukkig prijzen met zoveel lieve mensen om me heen! En de laatste jaren zijn er zeker weer een paar bijgekomen...dank jullie wel allemaal, laten we dit vooral nog heel lang blijven doen.

En als laatste mijn familie. Paps en Mams, Yvette, Sander en Lotte dank voor jullie steun! Ik geloof niet dat mijn bezoek frequentie de laatste tijd is toegenomen, maar jullie vertrouwen en bewondering is er niet minder op geworden. Dank dat jullie er altijd voor me zijn!

/ CURRICULUM VITAE

Dr. Cyrille Krul (1970) studeerde Gezondheidswetenschappen aan de Universiteit Maastricht en specialiseerde zich in de genetische toxicologie. Na haar studie werd ze aangesteld als assistent in opleiding aan de Universiteit Utrecht. Haar promotie onderzoek voerde ze uit bij het voormalige TNO Voeding in Zeist. Zij deed onderzoek naar de vorming van kankerverwekkende en beschermende ingrediënten uit de voeding. Daar bij maakte ze gebruik van het TNO *in vitro* Maagdarm Model (TIM). In die zelfde periode volgde zij ook de Postdoctorale Opleiding Toxicologie. Sinds 2001 is zij als toxicoloog geregistreerd in Europa. Na het behalen van haar doctors titel is ze werkzaam gebleven bij TNO. Daar leidde ze de onderzoeksgroep Genetische & In Vitro Toxicologie. Haar specialisme bereidde zich uit naar 'Alternatieven voor Dierproeven'. Binnen TNO coördineert zij het onderzoek binnen dit werkveld en zij neemt zitting in verscheidene nationale en internationale platforms op het gebied van alternatieve methoden. Sinds 2006 is zij verbonden aan HU als adviseur bij de minor opleiding en was zij nauw betrokken bij de oprichting van het kenniscentrum Life Sciences & Chemistry. In september 2007 is zij aangesteld als bijzonder lector binnen het lectoraat Innovative Testing in Life Sciences & Chemistry.

/ REFERENTIELIJST

Hoofdstuk 2

Russell WMS, Burch RL (1959) The principles of Humane Experimental Techniques (http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm)
'Noodzakelijk kwaad' Evaluatie Wet op de dierproeven, 21 maart 2005, commissie Freriks
Zo Doende 2007, Jaaroverzicht van Voedsel en Waren Autoriteit over dierproeven en proefdieren bij vergunninghoudende instellingen in Nederland, november 2008
Stichting Informatie Dierproeven: www.informatiedierproeven.nl

Hoofdstuk 3

'Humane endpoints in laboratory animal experimentation'
Nationaal Centrum Alternatieven voor dierproeven, 2006 (www.vet.uu.nl/nca_nl/documents/humane_endpoints)
3R Research Centre, Universiteit Nijmegen (www.umcn.nl/professional/afdelingen/cdl/3v_research_center)

Hoofdstuk 4

Kabinetvisie 'Alternatieven voor Dierproeven' 04.06.2008 (www.minvws.nl/kamerstukken/vgp/2008/kabinetvisie-alternatieven-voor-dierproeven.asp)
Subsidie programma overheid 'Dierproeven begrensd' (www.zonmw.nl/nl/onderwerpen/alle-programma-s/dierproeven-begrensd)
Herziening Europese proefdierrichtlijn 86/609/EG (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm)
Zesde en Zevende Kaderprogramma's Europese [ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/fp7/docs/alternative-test-strat_en.pdf](http://ftp.cordis.europa.eu/pub/fp7/docs/alternative-test-strat_en.pdf)
National Research Council, Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy National Academies Press, Washington, DC, 2007

Hoofdstuk 5

Regulation (EC) No 1907/2006 of the European parliament and the council, 18 December 2006, Concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)
Van der Jagt K, Munn S, Tørsløv J, de Bruijn J. (2004) Alternative approaches can reduce the use of test animals under REACH. Addendum to the report "Assessment of additional testing needs under REACH. Effects of (Q)SARs, risk based testing and voluntary industry initiatives". JRC Report EUR 21405 EN, 25pp. Ispra, Italy: European Commission, Joint Research Centre. (<http://ecb.jrc.it>)
7Th Amendment on the Cosmetic Directive 2003/15/EC
Alternative (Non-Animal) Methods for Cosmetics Testing: Current Status and Future Prospects, A Report Prepared in the Context of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive for Establishing the Timetable for Phasing Out Animal Testing. (2005) Edited by Chantra Eskes and Valerie Zuang, ATLA 33, Supplement 1.
The European Cosmetics Association [www.colipa.eu/priorities.html]
The European food Safety Authority Health Claims Regulation (EC) No 1924/2006

Hoofdstuk 6

Hartung T, Bremer S, Casati S, Coecke S, Corvi R, Fortaner S, Gribaldo L, Halder M, Hoffmann S, Roi A, Prieto P, Sabbioni E, Scott L, Worth A, Zuang V, (2004). A Modular Approach to the ECVAM Principles on Test Validity. ATLA 32, pp 467-472.
ReProTect FP6 project: Development of a novel approach in hazard and risk assessment or reproductive toxicity by a combination and application of in vitro, tissue and sensor technologies: (www.reprotect.eu)

Hoofdstuk 7

Krul, CAM (2001) Mutagenic and antimutagenic activity of food compounds. Application of a dynamic in vitro gastrointestinal model, proefschrift, Universiteit Utrecht

Guidance document on the validation of (quantitative) structure-activity relationship (QSAR) models. ENV/JM/Mon (2007) 2 OECD, 2007

Schaafsma G, Kroese ED, Tielemans ELJP, van de Sandt JJ, van Leeuwen, CJ (2009) REACH, non-testing approaches and the urgent need for a change in mind set. Regulatory Toxicology and Pharmacology 53, pp70-80

Verwei M, van Burgsteden JA, Krul CAM, van de Sandt JJ, Freidig AP (2006) Prediction of in vivo embryotoxic effect levels with a combination of in vitro studies and PBPK modelling. Toxicol Lett. 65(1): pp 79-87.

Hoofdstuk 8

Liang H, Yang Y, Yang K, Wu Y, Boone JM, Cherry, SR, (2007) A microPET/CT system for in vivo small animal imaging. Physics in Medicine and Biology, 52, pp. 3881-3894

Vijver MJ van de, He YD, Veer LJ van 't, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW (2002) A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N. Engl. J. Med. 347(25): pp 1999-2009.

auteurs dr. Raymond Pieters en dr. Cyrille Krul

eindredactie Marc Remijn en José Rensen

ontwerp en uitvoering Vormers

drukwerk Grafisch Bedrijf Tuijtel

lectoraat Innovative Testing in Life Sciences & Chemistry

openbare lessen Grenzen verleggen & bruggen bouwen, maart 2009

Kenniscentrum Innovative Testing in Life Sciences & Chemistry

Coordinator: dr. Marc Teunis

adres: F.C. Donderstraat 65, 3572 JE Utrecht

telefoon: 030 275 8860

e-mail: marc.teunis@hu.nl