

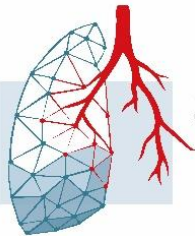


MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT
INNSBRUCK

Wieso an Tierversuchen kein Weg vorbeiführt...(?)

Univ.Prof. Mag.Dr. Michael J. Außerlechner

3D Bioprinting Core Facility der
Medizinische Universität Innsbruck



3D BIOPRINTING

INNSBRUCK



3Rs (Replacement, Reduction, Refinement)

Gefordert von William Russell and Rex Burch in ihrem 1959 erschienenen Buch

„The Principles of Humane Experimental Technique“



Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments. (www.frame.org.uk)

Ziel des 3R-Prinzips ist es,

Tierversuche zu vermeiden (**Replacement**),
die Anzahl der Tiere zu verringern (**Reduction**) und
das Leiden der Tiere in Versuchen zu beschränken (**Refinement**).

Das 3R-Prinzip ist die Grundlage für die Tierschutzpolitik in der EU (*Europäischen Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere*)

Ein Tierversuch *darf erst nach behördlicher Genehmigung* durchgeführt werden und vorab müssen folgende Fragen im Versuchsantrag adressiert werden:

a) Welche Alternativmethoden zum geplanten Tierversuch gibt es und kann er dadurch vermieden werden?

b) Ist die Anzahl der Versuchstiere gerechtfertigt bzw. wird nur eine für die statistische Analyse absolut notwendige Anzahl an Versuchstieren verwendet?

⇒ Reduction & Refinement

c) Ist die Belastung, der das Versuchstier ausgesetzt ist, so gering wie möglich?

⇒ Replacement: Standardformulierungen, die Punkt a) für die Tierethikkommission argumentieren („nur im Gesamtorganismus adressierbar“, kein ausreichend komplexes in vitro System verfügbar“, etc.)



Wieso braucht Medizinische Forschung Tierversuche?

Übliche Antworten sind:

„Nur im Versuchstier kann die Komplexität einer Behandlung vollständig erfasst werden“

„Tierversuche sind seit Jahrzehnten der *Goldstandard für Medikamentenentwicklung und die Erforschung von Erkrankungen* („Disease Modelling“)"

„Tierversuche sind für die Zulassung neuer Medikamente und Behandlungen vorgeschrieben“ (z.B. FDA seit 1938)

„Tierversuche hätten Medikamenten-Tragödien wie Contergan verhindert“

„Die Funktion von Genen kann nur im komplexen Organismus erforscht werden“

„Die Reviewer verlangen Validierung der Hypothesen / Wirkstoffe im Tier“

=> Offensichtlich gibt es fast nur Gründe für die Durchführung von Tierversuchen!

Aber:

Die am häufigsten verwendeten Versuchstiere, Mäuse und Ratten, haben sich *vor ca. 80-100 Mio Jahren* evolutionär von der menschlichen Entwicklungslinie getrennt. Deshalb existieren *signifikante Unterschiede in Physiologie, Verhalten, Ernährung und Metabolismus*.

Bis zu 95% aller Wirkstoffe, die im Tierversuch erfolgreich getestet wurden, sind am Menschen *entweder unwirksam oder toxisch*. Das bedeutet eine extreme Verschwendung von Tieren und ist auch ein Grund für die hohen Kosten neuer Medikamente.

Es gilt vermutlich auch der Umkehrschluss: im Tierversuch erfolglose Wirkstoffe könnten sehr wohl wirksam im Menschen sein, *gelangen aber nie in die pharmazeutische Entwicklung*

Die letzten 2 Jahrzehnten erlebten mit *reprogrammierten Stammzellen (iPSCs), Organoiden, Microfluidics und Bioprinting* einen dramatischen technologischer Fortschritt, sodass *inzwischen sehr komplexe in vitro Testsysteme zur Verfügung* stehen.

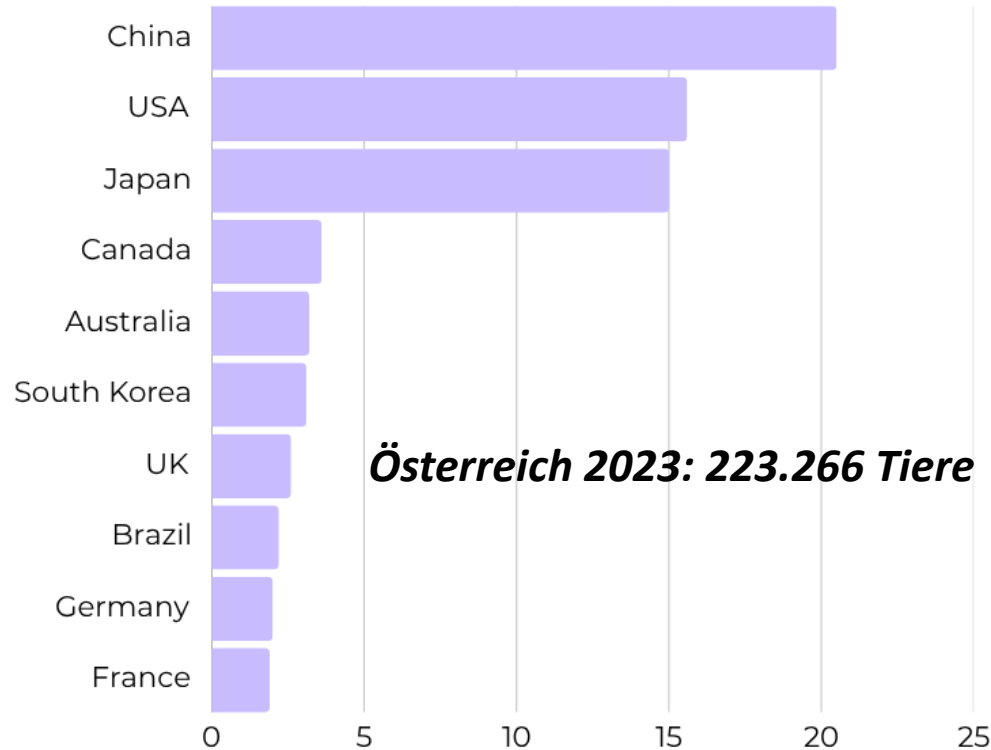
***Rechtfertigt die hohe Ausfallquote z.B. bei der
Medikamentenentwicklung die Anzahl jährlich geopferter
Versuchstiere?***

&

***Wie viele Versuchstiere werden eigentlich pro Jahr in
biomedizinischen Experimenten „verbraucht“?***

Ca.192 Millionen Tiere wurden 2015 weltweit für wissenschaftliche Zwecke geopfert

● experimental animals (2015, estimated, Mio.)



Österreich 2023: 223.266 Tiere

<https://total.vet/animal-testing-statistics>



<https://crueltyfreeinternational.org>

<https://www.peta.de>

=> Ökonomischer Aspekt: Tierversuche sind in Multi-Milliarden Dollar Geschäft!!

***„Alle Medikamente müssen im Tier getestet werden, bevor
man sie am Menschen erproben kann!“***

Contergan/Thalidomid

Als häufiges Argument für Tierversuche in der Medikamentenentwicklung wird die Contergan Tragödie angeführt, da der der Wirkstoff Thalidomid nicht auf eine teratogene Wirkung getestet wurde.

1959 zugelassen, sehr bald nach der Zulassung wurden erste Kinder mit Phokomelie (Robbengliedrigkeit) geboren

1961 in Westeuropa und den USA vom Markt genommen

10.000 – 20.000 Fälle weltweit

Aber: bei Mäusen und Ratten ist eine teratogene Wirkung erst bei einer ca. 300mal höheren Konzentration (300 mg/kg) sporadisch nachweisbar, beim Menschen bei ca. 1 mg/kg.

Grund dafür ist eine fetale Cytochrom P450 Variante (CYP3A7) im Menschen, die Thalidomid in einen toxischen Metaboliten umwandelt

=> Menschen sind halt keine 70 -80 kg schweren Mäuse oder Ratten!!



Contergan-Opfer demonstrieren in Berlin (c) dapd (Adam Berry)

TGN1412

Monoklonaler Antikörper von *TeGenero Immuno Therapeutics* zur Therapie von Leukämien und Autoimmunkrankheiten (Agonist f. CD28 auf T-Zellen)

Präklinische Studien an Kaninchen und Rhesusaffen zeigten keine Risiken!

Phase I Studie in 6 gesunden Probanden mit subklinischen Dosen induzierte eine „Zytokinsturm“ mit Multi-Organversagen und entsprechender Intensivmedizinischer Behandlung

Patienten überlebten mit z.T. massiven Gewebeschäden



Wie relevant sind also Erprobungen im Tier, wenn trotzdem nach Erfüllung aller Reglements solche humanspezifischen Effekte auftreten?

***Die Entwicklung neuer biomedizinischer Methoden
(„new (animal-free) approach methods – NAMs“)
könnte einen signifikanten Teil der derzeit
durchgeführten Tierversuche ersetzen.***

Den Hauptanteil in Forschung, Medikamenten & Lebensmittelsicherheit sollten entsprechend sogenannte „*new (animal-free) approach methods (NAMs)*“ in Zukunft leisten.

Dies wird sowohl von der EMA, als auch vom Europäischen Parlament gefordert

(2021/2784(RSP) Resolution on plans and actions to accelerate the transition to innovation without the use of animals in research, regulatory testing and education)

Nach Dekret von Präsident Biden im Dezember 2022 verlangt die FDA für Studien am Menschen nichtmehr zwingend Tierversuche!! *(Science, 10. Jänner 2023)*

Archives of Toxicology (2020) 94:2263–2272
<https://doi.org/10.1007/s00204-020-02787-2>

GUEST EDITORIAL



Harnessing the power of novel animal-free test methods for the development of COVID-19 drugs and vaccines

Francois Busquet^{1,2} · Thomas Hartung^{1,3} · Giorgia Pallocca¹  · Costanza Rovida¹ · Marcel Leist^{1,4}

Received: 29 April 2020 / Accepted: 18 May 2020 / Published online: 23 May 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

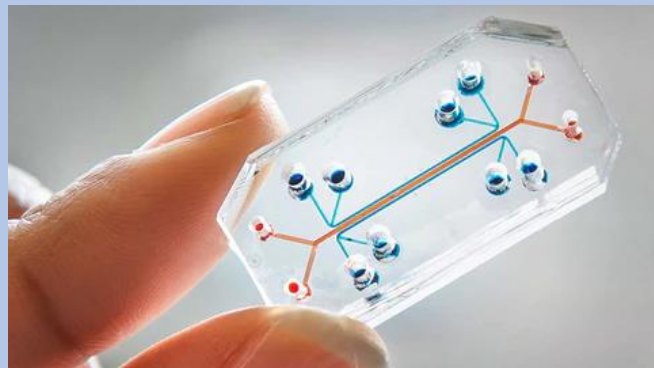
The COVID-19-inducing virus, SARS-CoV2, is likely to remain a threat to human health unless efficient drugs or vaccines become available. Given the extent of the current pandemic (people in over one hundred countries infected) and its disastrous effect on world economy (associated with limitations of human rights), speedy drug discovery is critical. In this situation, past investments into the development of new (animal-free) approach methods (NAM) for drug safety, efficacy, and quality evaluation can be leveraged. For this, we provide an overview of repurposing ideas to shortcut drug development times. Animal-based testing would be too lengthy, and it largely fails, when a pathogen is species-specific or if the desired drug is based on specific features of human biology. Fortunately, industry has already largely shifted to NAM, and some public funding programs have advanced the development of animal-free technologies. For instance, NAM can predict genotoxicity (a major aspect of carcinogenicity) within days, human antibodies targeting virus epitopes can be generated in molecular biology laboratories within weeks, and various human cell-based organoids are available to test virus infectivity and the biological processes controlling them. The European Medicines Agency (EMA) has formed an expert group to pave the way for the use of such approaches for accelerated drug development. This situation illustrates the importance of diversification

s into a single

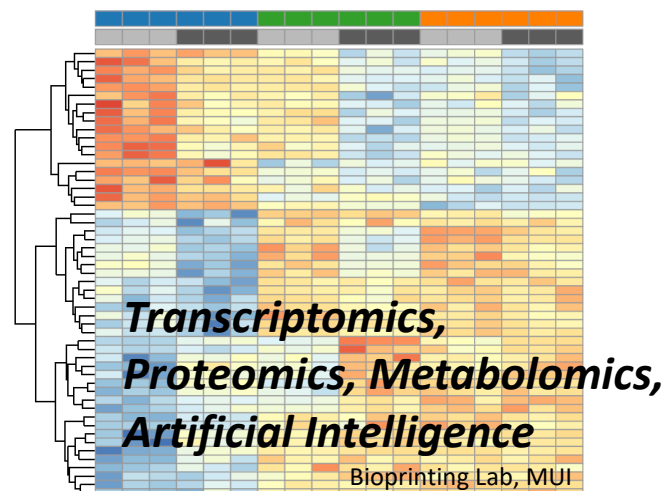
The European Medicines Agency (EMA) has formed an expert group to pave the way for the use of such approaches for accelerated drug development. This situation illustrates **the importance of diversification in drug discovery strategies and clearly shows the shortcomings of an approach that invests 95% of resources into a single technology (animal experimentation)** in the face of challenges that require alternative approaches

Was sind New (animal-free) Approach Methods (NAMs)?

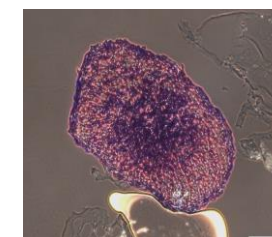
Beispiele für: New Approach Methods (NAMs):



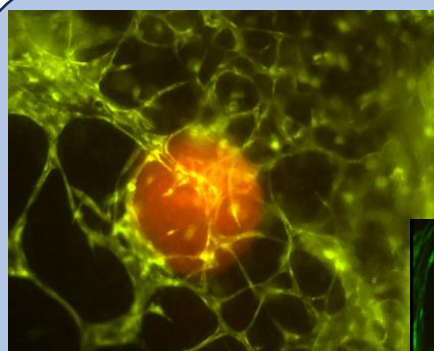
<https://darwin-microfluidics.com/>



**Reprogrammierte
Stammzellen-Zellen
(iPSCs)**

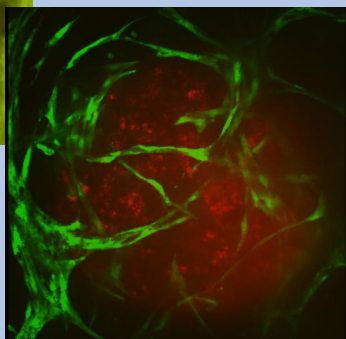


Bioprinting Lab, MUI

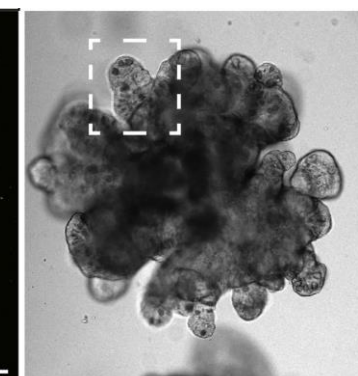
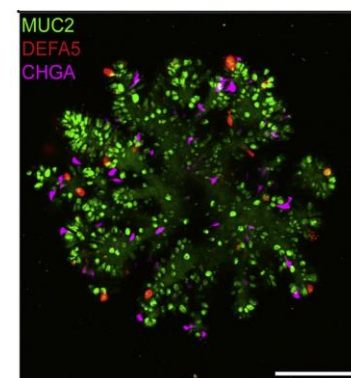


**Bioprinted
Tissue**

Bioprinting Lab, MUI

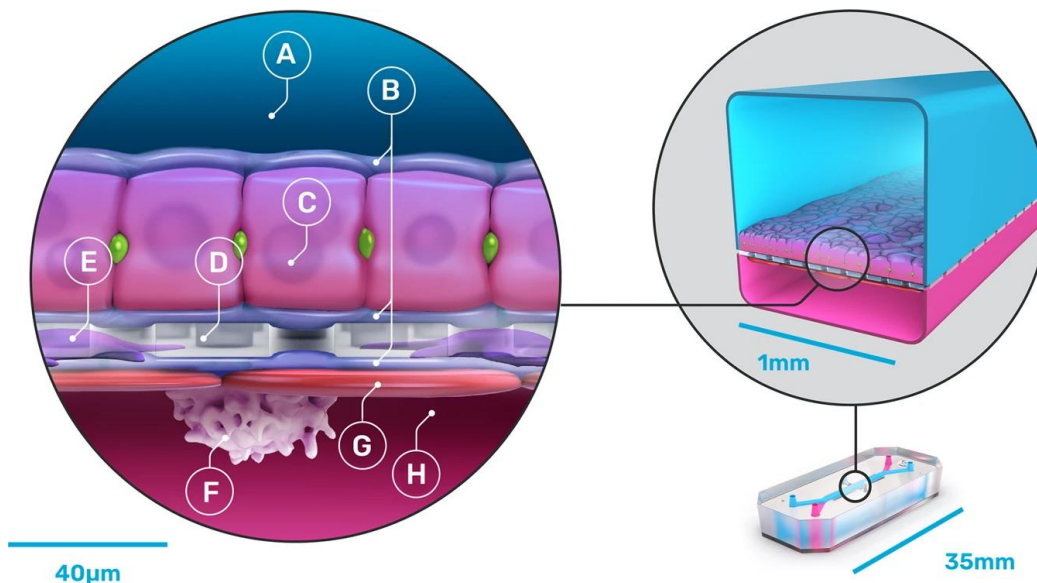


Organoide



He et al, Cell Stem Cells 2022

Beispiel: „Liver-on-Chip“ der Firma *Emulate*



Ewart et al, Communications Medicine, Dec. 2022

Humane Hepatozyten (C) in extrazellulärer Matrix (B) auf poröser Membran (D).
Leberparenchymkanal (A)

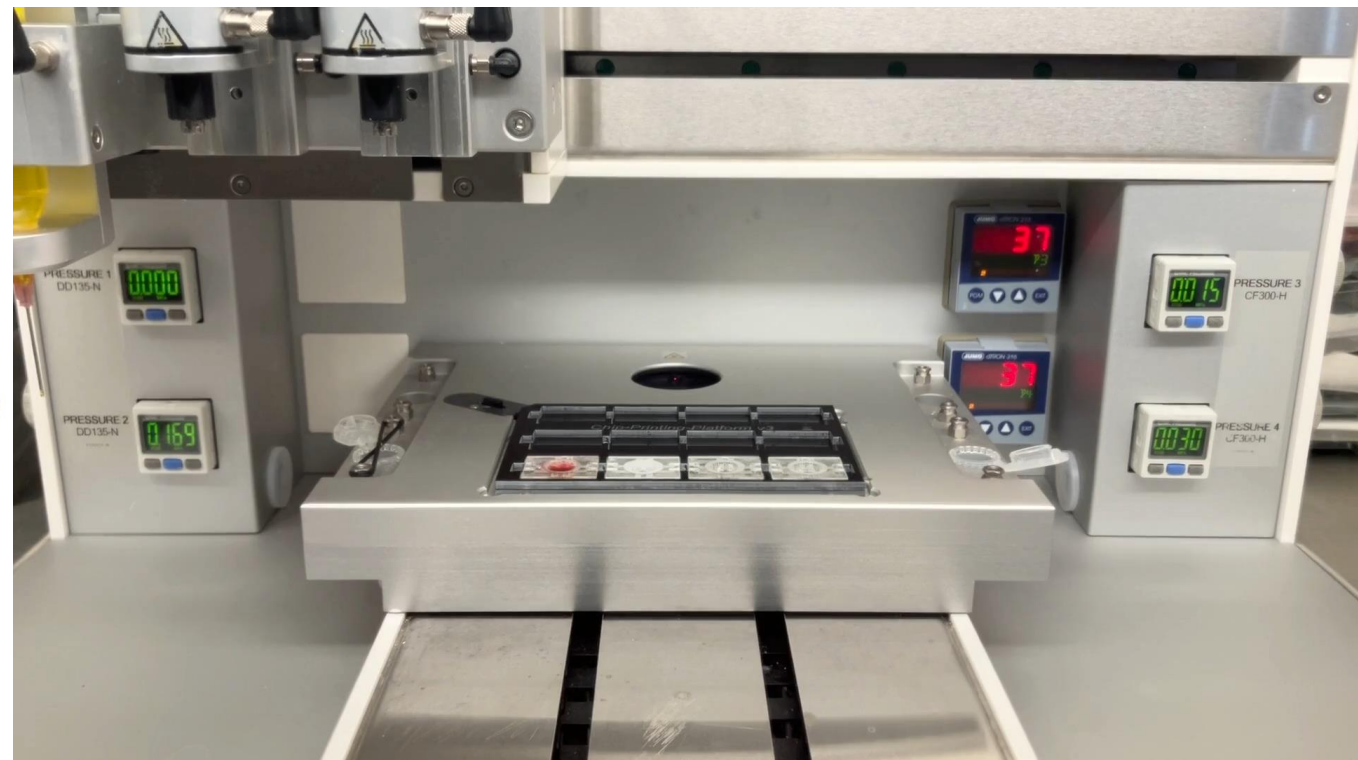
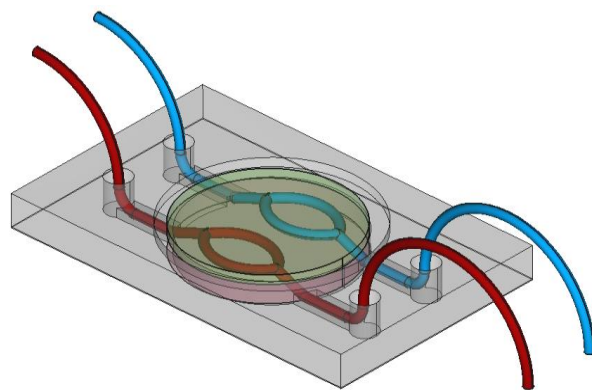
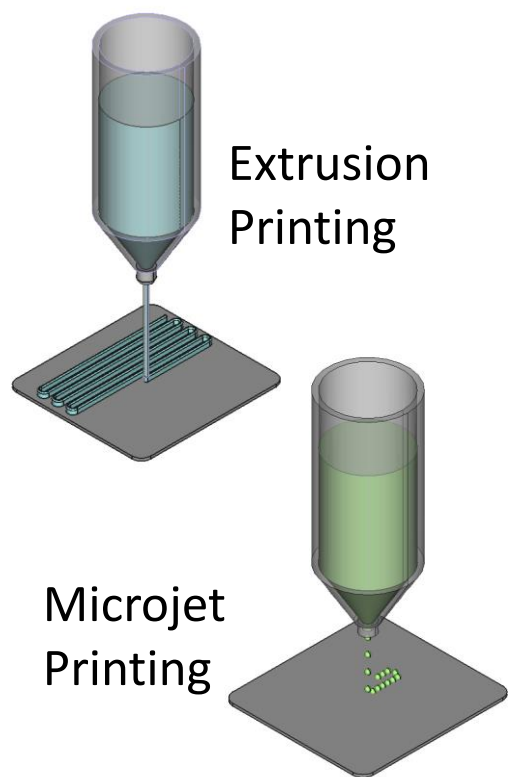
Humane Lebersinus-Epithelzellen (G), Kupffer Zellen (F) und Sternzellen (E) auf Unterseite der Membran (H).

Chip sagt mit 87%iger Wahrscheinlichkeit Lebertoxizität im Menschen vorher!

=> Damit können im Leberchip toxische Kandidaten-Substanzen schon in einer frühen Testphase ausgeschieden werden und so Toxizitätstests in Tieren entfallen

Beispiel: „3D Biogedruckte Gewebechips“

Lebendes Gewebe und „Blutgefäße“ werden mithilfe eines Biodruckers in 3D strukturiert aufgebaut, sodass das Gewebe anschließend mit Nährmedium durchspült und so wochenlang ernährt werden kann.

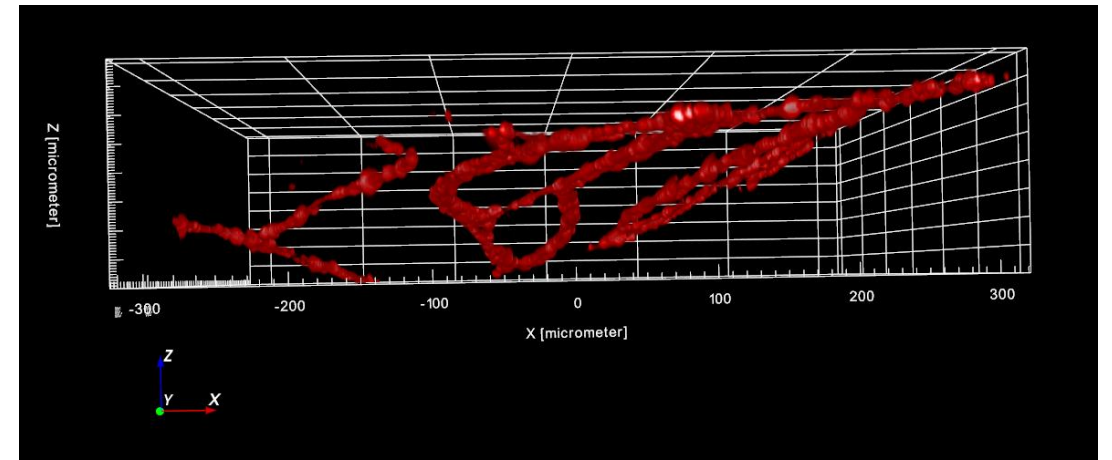
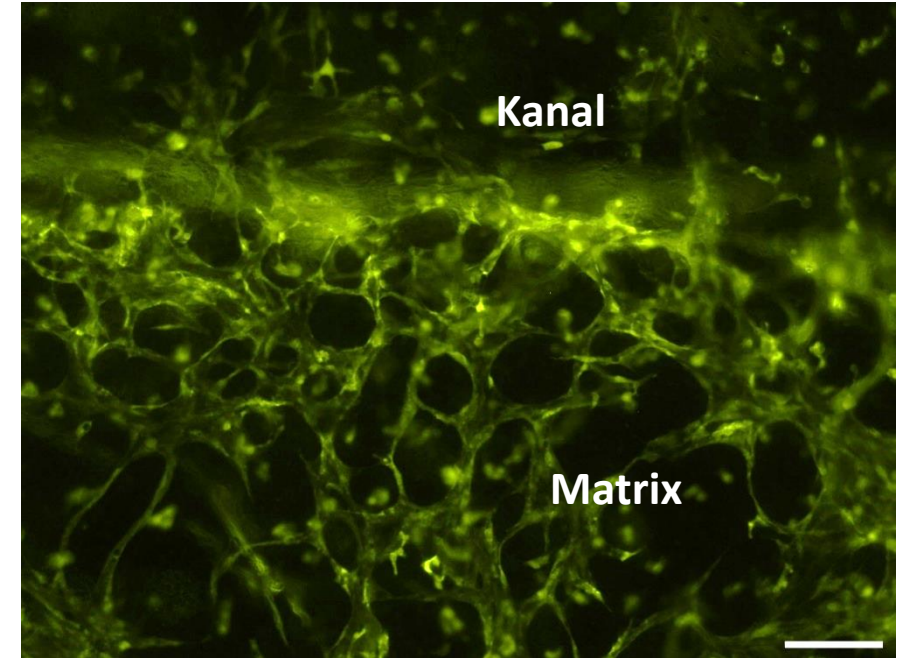


Wachsen von Mikrogefäßen im 3D Biogewebe-Chip

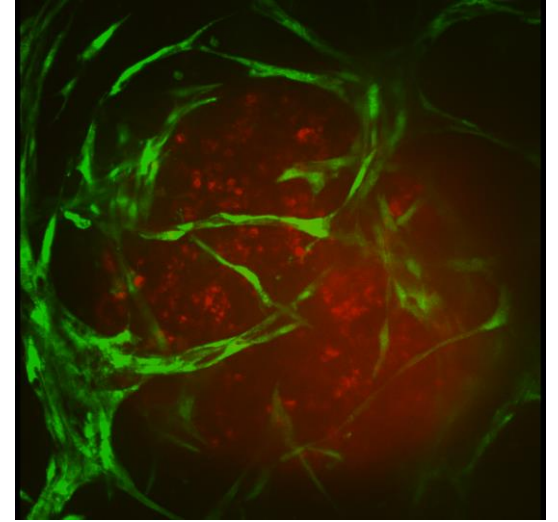
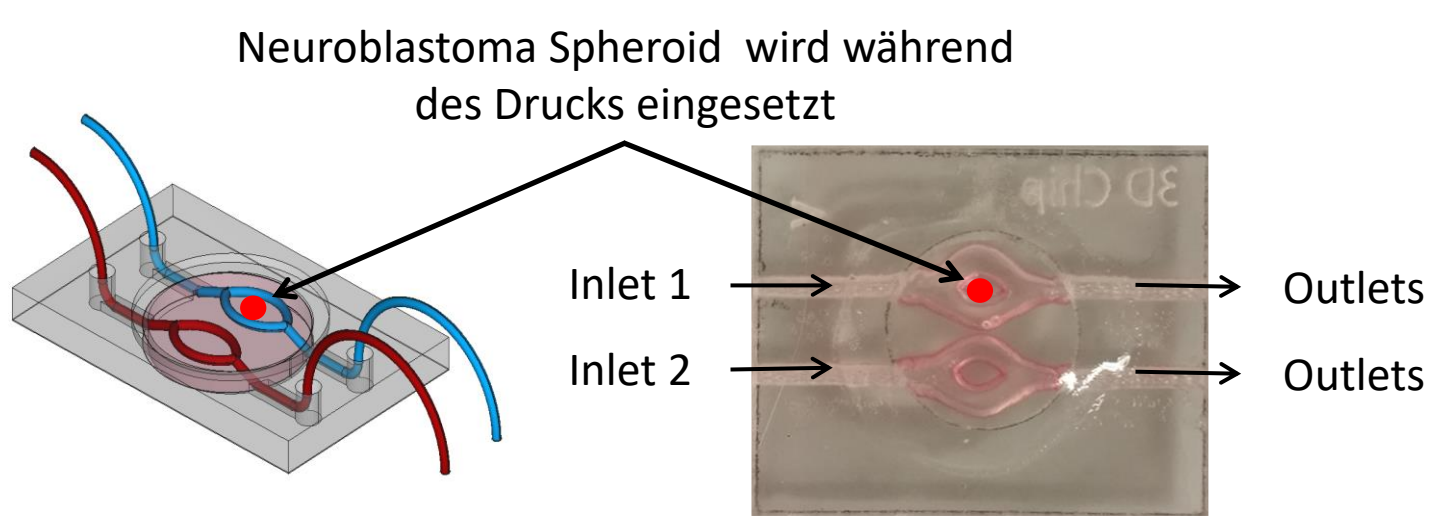
Matrix mit Endothelzellen und weiteren Zelltypen 7 Tage nach dem Druck

➡ *Durch Kombination verschiedener Zelltypen und Proteine in der Biotinte entstehen spontane Kapillarnetzwerke*

➡ *Aufbau wie menschliches Gewebe mit feinsten „Blutgefäßen“*

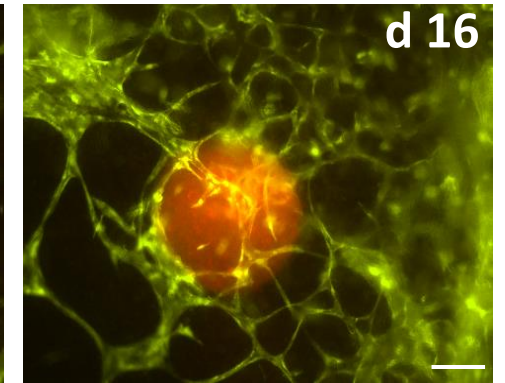
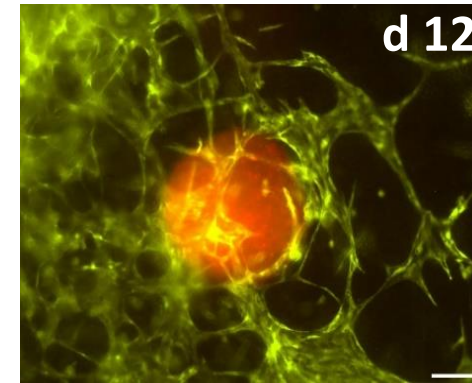
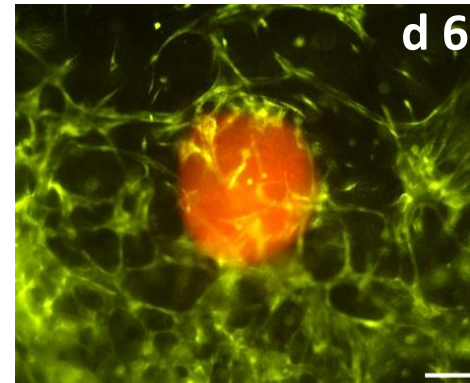
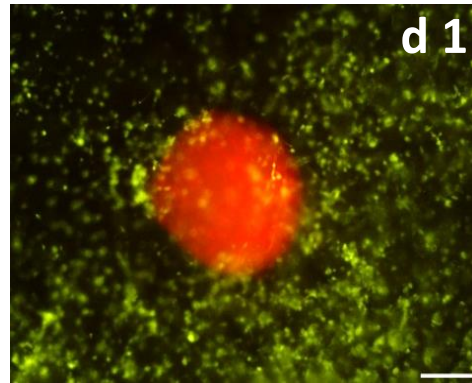


Tumor Angiogenese in 3D gedrucktem Tumor-on-chip Model



Grün: Endothel
Zellen

Rot:
Neuroblastom
Spheroid

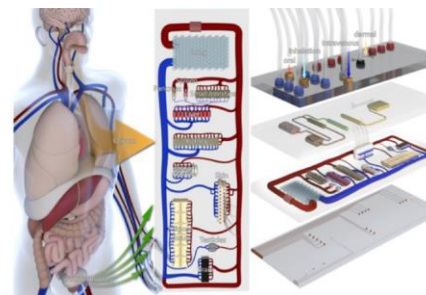


=> Gefäße wachsen in den Tumor ein und spiegeln somit Blutgefäßneubildung während des Tumorwachstum wider

=> Menschliches Testsystem für Hemmer der Blutgefäßneubildung bei Tumoren

Was sind die Vorteile von NAMs?

1. Es werden **menschliche Zellen** (primär vom Patienten oder aus iPS-Zellen) verwendet, dadurch wird der „evolutionary gap“ zwischen Tier und Mensch vermieden!
2. Microfluidics, Organoide oder Biogedrucktes Gewebe bilden ein bis wenige Organe ab, d.h. **die Wirkung einer Substanz auf das entsprechende Zielgewebe kann direkt**, meist „online“ studiert werden, ohne Einfluss des Gesamtmetabolismus
3. Effiziente **Parallelisierung, Standardisierung und Patienten-bezogene**, personalisierte Analysen („patient-on-chip“)
4. „Human-on-chip“ Systeme (z.B. TissUse Berlin) erlauben die **Kombination verschiedener Organ-typischer Gewebe** um Teile des Gesamtorganismus zu simulieren



“Human-on-a-Chip”
Human und systemisch

***Der logische Schluss sollte also sein, dass Tierversuche
nur eine ergänzende, vielleicht sogar untergeordnete
Rolle in der biomedizinischen Forschung spielen!***

Wieso wird dann Tiermodellen noch immer der Vorzug gegeben?

=> **Verfügbarkeit (79%)**

=> **vorhandener Erfahrung (62%)**

=> **Ähnlichkeit von Symptomen mit menschlicher Erkrankung (59%)**

„Tradition, Not Science!“

Research Article

Tradition, Not Science, Is the Basis of Animal Model Selection in Translational and Applied Research

Désirée H. Veening-Griffioen¹, Guilherme S. Ferreira¹, Wouter P. C. Boon², Christine C. Gispen-de Wied³, Huub Schellekens¹, Ellen H. M. Moors² and Peter J. K. van Meer^{1,4}

¹Utrecht Institute of Pharmaceutical Sciences, Utrecht, The Netherlands; ²Copernicus Institute of Sustainable Development, Utrecht, The Netherlands;

³Gispen⁴RegulatoryScience: advies en educatie, Bilthoven, The Netherlands; ⁴Medicines Evaluation Board, Utrecht, The Netherlands

Abstract

National and international laws and regulations exist to protect animals used for scientific purposes in translational and applied research, which includes drug development. However, multiple animal models are available for each disease. We evaluated the argumentation behind the selection of a specific animal model using thematic content analysis in project applications issued in 2017-2019 in the Netherlands. In total, 125 animal models for translational and applied research from 110 project applications were assessed. Explanations to select a specific model included: the model's availability (79%); the availability of expertise (62%); and the model showing similar disease pathology/symptoms (59%) to humans. Therefore, current selection of a specific animal model seems to be based on tradition rather than its potential predictive value for clinical outcome. The applicants' explanations for the implementation of the 3R principles (replacement, reduction and refinement) as to the animal model were unspecific. Replacement was achieved by using data from prior *in vitro* studies, reduction by optimal experimental design and statistics, and refinement by reducing discomfort. Additionally, due to the stated need for a test model with high complexity (47%) and intactness (30%), the full replacement of animal models with alternative (non-live animal) approaches was thought unachievable. Without a



Obwohl Wissenschaftler meist sehr schnell innovative neue Methoden aufnehmen, scheint dies bei NAMs nur sehr schleppend der Fall zu sein.

Problem: international begutachtete Forschungsprojekte werden häufig abgelehnt, weil eben Gutachter zusätzlich oder statt der NAMs Tierversuche verlangen!!

=> Keine Funding - keine Entwicklung – keine Änderungen!

=> Förderinstitutionen (z.B. FWF) sollten ein besonderes Augenmerk auf die Verwendung von NAMs legen!

=> Universitäre Lehre mit Fokus auf NAMs, um die Wissenschaftler von morgen darauf zu trainieren!

„Wieso an Tierversuchen kein Weg vorbeiführt – oder vielleicht doch?“

*Biogedruckte Gewebe, Microfluidics, Organoide, Omics Analysen sowie darauf basierende Computersimulationen werfen die Frage auf, wie zeitgemäß Tierversuche in vielen Fällen noch sind und wie sie durch smarte neue Strategien **ergänzt, reduziert und ersetzt** werden können.*

*Diese neuen Technologien ersetzen nicht nur Tierversuche, sondern können auch besser **standardisiert, reproduziert und personalisiert** werden.*

*Dies steigert die **Datenqualität, Vergleichbarkeit und Verwendbarkeit der Ergebnisse** zum Verständnis und der Therapie menschlicher Erkrankungen.*



„Wieso an Tierversuchen kein Weg vorbeiführt – oder vielleicht doch?“

Innovationen auf dem Gebiet der NAMs bringen

Patentierungen und Gebrauchsmuster für innovative neue Technologien

Patientenspezifische (Precision Medicine) Anwendungen & Diagnostik

Neue Firmen im Bereich Biomedizin, neue Arbeitsplätze

Die Förderung Alternativmethoden hat neben ethischen und wissenschaftlichen, auch einen sozio-ökonomische Impact und ist eine Investition in die Zukunft!!

Allerdings:

Der Einfluss mancher Substanzen, Gene u Therapien auf den gesamten Organismus ist final leider noch immer nur im lebenden Tier verifizierbar!



FGF5 KO-Maus