



Nationaal Comité
advies dierproevenbeleid

Streefbeeld voor proefdiervrije innovaties in de immunologie



Nationaal Comité advies dierproevenbeleid

Dit streefbeeld is gemaakt met een bijdrage van de volgende experts;

Immunologiewerkgroep

- Prof. dr. Teunis B.H. Geijtenbeek, afdeling Experimentele immunologie, Amsterdam UMC (voorzitter werkgroep)
- Prof. dr. Susan Gibbs, afdeling Moleculaire celbiologie en immunologie, Amsterdam UMC en afdeling Orale celbiologie, Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam (ACTA)
- Dr. Jeffrey Bajramovic, 3Rs Centre Utrecht, Universiteit Utrecht
- Prof. dr. Jeanette H.W. Leusen, Center for Translational Immunology Research, UMC Utrecht
- Prof. dr. Johan Garssen, afdeling Farmacologie, Universiteit Utrecht en Danone Nutricia Research

Een impuls geven aan de transitie binnen de immunologie

Immunologisch onderzoek is gericht op het verkrijgen van inzicht in de moleculaire en cellulaire processen die ten grondslag liggen aan de pathologie van ziekten en infecties bij mensen. Ook richt het zich op het ontwikkelen van interventies om deze ziekten en infecties te behandelen of voorkomen. Het onderzoek omvat de fundamentele en toegepaste wetenschap van immunologische processen op het niveau van moleculen, cellen, weefsels en het organisme. Voor het modelleren van veel van deze processen werden en worden diermodellen gebruikt¹. Maar het wordt steeds duidelijker dat diermodellen slechts modellen zijn en, nog belangrijker, dat het mogelijk niet eens de beste modellen zijn. Het vakgebied van de immunologie ontwikkelt zich in hoog tempo. Nieuwe technologische en medische vooruitgang heeft geleid tot de ontwikkeling van innovatieve humane modellen, die de potentie hebben om diermodellen te vervangen. Met deze diervrije methodes, of zogenaamde 'new approach methodologies' (NAM's), wordt het mogelijk om immunologische processen veel gedetailleerder te onderzoeken, met meer relevantie voor ziekten en infecties bij mensen².

Het doel van de Immunologiewerkgroep was het ontwikkelen van een routekaart die een impuls geeft aan de transitie naar het gebruik van NAM's binnen de immunologie. Door de ontwikkeling van NAM's zal niet alleen het gebruik en het lijden van proefdieren verminderen, maar - zoals eerder opgemerkt - hebben NAM's ook de inherente potentie om immunologie en ziekten bij mensen beter te modelleren dan met diermodellen mogelijk is. Deze inzichten vormen de basis voor dit streefbeeld en er worden aanbevelingen gedaan voor de ontwikkeling, verbetering en implementatie van NAM's. Hierbij is het streven om de wetenschap vooruit te helpen en tegelijkertijd de wetenschappelijke afhankelijkheid van dieren te verlagen.

Dit is gedaan door allereerst de soorten NAM's vast te stellen die momenteel worden gebruikt en/of ontwikkeld in immunologisch onderzoek. De voordelen en de beperkingen van NAM's werden geanalyseerd en hiermee zijn doelen opgesteld voor zowel de nabije toekomst als de toekomst op langere termijn. Tenslotte zijn de belangrijkste belemmeringen vastgesteld voor de implementatie van NAM's en wordt besproken hoe met deze belemmeringen kan worden omgegaan.

Index

	1. Aanbevelingen, een overzicht	5		4. Innovaties in NAM's in de nabije toekomst	15
	Regelgeving en besluitvorming	5		In <i>vitro</i> modellen	15
	Onderwijs	6		<i>Dierlijke producten</i>	15
	Delen en toegang	6		Verbeteringen voor de nabije toekomst	17
	Onderzoek	6		In <i>vivo</i> onderzoeken bij mensen	18
	2. Immunologie voor het behandelen en voorkomen van infecties, ontstekingsziekten en kanker	8		5. Transitiedoel	19
	Diermodellen binnen de immunologie	8		Slotaanbevelingen voor transitie	21
	Voordelen en beperkingen van diermodellen	9			
	Behoeftte aan humane modellen voor humane immunologie	9			
	3. New Approach Models op verschillende niveaus van complexiteit	11			
	In <i>vitro</i> modellen	13			
	In <i>vivo</i> onderzoeken bij mensen	13			

1. Aanbevelingen, een overzicht



Regelgeving en besluitvorming

Studies met vrijwilligers of patiënten worden steeds haalbaarder door de toenemende beschikbaarheid van meer gevoelige (niet-invasieve en routinematige) analytische methoden. Kennis over de mogelijkheden voor dit soort studies zou moeten worden gedeeld en gestimuleerd. Zeer belangrijk is dat ethische beperkingen en bureaucratische **regelgevingsprocedures waar mogelijk worden vereenvoudigd. Ook is van groot belang dat voorbereidingen voor het uitvoeren van onderzoek direct bij mensen en fase 0-onderzoeken worden ondersteund. Hierdoor kan rechtstreekser worden geconcentreerd met benaderingen op basis van dieren.**

Daarnaast zou het gebruik van proefdieren zowel door instellingen als door onderzoekers kritischer moeten worden beoordeeld, omdat er mogelijk geschiktere modellen bestaan voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. Initiatieven om **toegang tot informatie over NAM's te faciliteren** zouden gestimuleerd moeten worden, en toegang tot dergelijke informatie zou eenvoudig beschikbaar moeten zijn **voor instanties voor dierenwelzijn en ethische commissies.**

Voor het bereiken van de transitiedoelen die in dit streefbeeld worden beschreven is financiering op landelijk niveau en vanuit gezondheidsorganisaties onmisbaar. Daarom zou het goed zijn als er meer **persoonlijke fellowships en subsidies** worden ontwikkeld door financieringsinstanties **voor beginnende en ervaren wetenschappers die zich toeleggen op het ontwikkelen of gebruiken van NAM's.** Ook financiering voor grote consortia zijn hierin van belang. Dit zou moeten leiden tot een **loopbaan** in de life-science die niet geheel afhankelijk is van resultaten behaald met proefdieronderzoek

Schrijf een **document met sterke, heldere argumenten over de fysiologische relevantie van humane studies die worden uitgevoerd zonder proefdieren, maar met NAM's** en verspreid dit document onder onderzoekers. De redactie van wetenschappelijke tijdschriften kan namelijk druk uitoefenen om proefdieronderzoek uit te voeren. Dit document kan de onderzoekers helpen om de dierstudie-argumenten te weerleggen en de druk van wetenschappelijke tijdschriften te weerstaan. Een standaardbrief met deze argumenten, ondertekend door mensen, organisaties en instellingen met autoriteit, zou onderzoekers ook kunnen helpen.



Onderwijs

Een van de belangrijkste aanbevelingen is om **de training van en het onderwijs aan wetenschappers aan het begin van hun loopbaan** te stimuleren. Informatie en onderwijs over NAM's en de voortgang die hierin is geboekt binnen het werkveld dient te worden aangeboden door universiteiten en in postdoctorale studies (zie ook Streefbeeld voor innovatie in het hoger onderwijs met minder proefdieren)¹.

Om het **overnemen en implementeren van het Streefbeeld te bevorderen, moet samenwerking en inbedding worden gezocht** met de Nederlandse Vereniging voor Immunologie (NVVI²).

Jonge onderzoekers moeten er bewust van worden gemaakt dat NAM's een beter alternatief kunnen zijn dan proefdieronderzoek voor het beantwoorden van specifieke immunologische vraagstukken en dat nieuwe technologieën de mogelijkheden van NAM's ten opzichte van proefdieronderzoek nog verder vergroten. Structurele aandacht voor NAM's moeten daarom worden ingebed in het jaarlijkse nationaal Congres Immunologie.

Delen en toegang

Er bestaan veel verschillende modellen op basis van immuuncellijnen, waarmee genetische manipulatie en robuuste analyses mogelijk zijn. Innovatieve technieken maken genetische manipulatie en langdurige kweek van primaire humane immuuncellen mogelijk, waardoor het gebruik van primaire cellen in immunologische modellen aantrekkelijker en haalbaarder wordt. Het is daarom belangrijk om toegang tot humane primaire immuuncellen (bijv. bloedcellen) en weefsels te **faciliteren voor elke onderzoeker via open access biobanken** (voor weefsels die verwijderd zijn via (plastische) chirurgie) en **gecentraliseerde voorzieningen** (bloedbanken, weefselcentra). Een tekort aan weefsels staat de transities in de weg³.

Innovatieve analytische technieken en methoden leveren een overvloed aan gegevens over patiënten op (genen, eiwitten, metabolisme). **Toegang tot en**

¹ Streefbeeld voor innovatie in het hoger onderwijs met minder proefdieren Universiteiten van Nederland (UNL), Nederlandse Federatie van Universitair Medische Centra (NFU); 2022.

² NVVI [Beschikbaar via: <https://www.nvvi-dsi.nl/>]

³ De beschikbaarheid en toegankelijkheid van menselijk weefsel voor biomedisch onderzoek en onderwijs. Nationaal Comité advies dierproevenbeleid; 2023. Rapportnummer: 23400365.

hergebruik van patiëntgegevens maakt het mogelijk dat andere onderzoekers deze gegevens kunnen gebruiken voor hun eigen onderzoek. Er is al regelgeving van kracht, zoals Fair Science, maar er moet verder worden ingezet op het faciliteren van toegang tot en het juiste gebruik van deze gegevens.

Onderzoek

Het gebruik van **producten van dierlijke oorsprong, zoals celweekreagentia** (bijv. foetaal kalfsserum, groeifactoren, enzymen, matrigels en antilichamen) **moet zo veel mogelijk worden beperkt** om ethische en wetenschappelijke redenen^{4,5,6}. Er zijn geschikte alternatieven beschikbaar die niet van dieren afkomstig zijn, maar onderzoekers zijn terughoudend om over te stappen op andere modellen en de kosten zijn vaak hoger. Daarom zijn **gecentraliseerde inspanningen en specifieke subsidiemogelijkheden** noodzakelijk.

Stimuleer het uitvoeren van vergelijkende studies van proefdieren en NAM's door wetenschappers samen te brengen en door **specifieke financiering van parallelstudies**. (zie de Rapportage NCad parallelstudies advies) **Instellingen zouden naast een proefdierfaciliteit een centrale NAM-faciliteit moeten hebben voor trainingsdoeleinden en voor het faciliteren van proefdieronderzoek**. Dit kan ook dienen om NAM's verder te ontwikkelen zodat ze minder geschikte diermodellen kunnen vervangen of om parallelstudies te starten. Een nauwe verbinding met de proefdierfaciliteit kan helpen bij het kiezen van het beste model en het faciliteren van parallelstudies.

Ondersteun studies die zich richten op het verkrijgen van inzicht in de translationele lacunes tussen diermodellen en de menselijke ziekte die wordt gemodelleerd.

Als diermodellen er niet in zijn geslaagd om de reacties bij mensen te voorspellen, introduceer de onderzoeker dan bij netwerken die zich richten op het modelleren van ziekten bij mensen in NAM's, zoals hDMT⁷.

⁴ Sebastian Eggert JW, Jessica Rosolowski & Tilo Weber. Practical Workshop on Replacing Fetal Bovine Serum (FBS) in Life Science Research: From Theory into Practice. ALTEX; 2022.

⁵ Kozłowski MT, Crook CJ, Ku HT. Towards organoid culture without Matrigel. Commun Biol. 2021;4(1).

⁶ Bradbury ARM, Dübel S, Knappik A, Plückthun A. Animal- versus in vitro-derived antibodies: avoiding the extremes. Mabs-Austin. 2021;13(1).

⁷ hDMT [Beschikbaar via: www.hdmt.technology].



Ontmoedig onderzoekers dieren te gebruiken als **'black box'-modellen voor ziekten** waarvan de oorzaken niet precies bekend zijn. **Stimuleer** onderzoekers (zo nodig via ethische commissies) om in plaats daarvan **onderzoeksvragen te herformuleren richting het verkrijgen van inzicht in humane (pathologische) mechanismen.**

Voor het beantwoorden van relevante onderzoeksvragen naar mechanismen die tot pathologie leiden, moeten NAM's, van uiteenlopende complexiteit, worden overwogen.

Stimuleer verdere interdisciplinaire samenwerking, omdat verschillende werkvelden nodig zijn om innovatieve NAM's verder te ontwikkelen. Samenwerking met het nationale consortium human organ and Disease Model Technologies (hDMT) biedt immunologen de mogelijkheid om in een interdisciplinair verband samen te werken met celbiologen, (weefsel)ingenieurs en het bedrijfsleven om de modellen verder te ontwikkelen en implementatie te ondersteunen.

Hoogwaardige kweekmodellen zoals geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC's), organs-on-a-chip, kweken van hele weefsels en organoïden zijn uiterst belangrijke modellen voor het onderzoeken van immunologische mechanismen en immuunpathologieën. Het brede gebruik van deze modellen wordt echter gehinderd door gecompliceerde protocollen en de gespecialiseerde kennis die nodig is. **Er zijn gespecialiseerde centrale faciliteiten of centra nodig** die (jonge) onderzoekers trainen en ondersteunen in het gebruik van deze innovatieve modellen.



2.

Immunologie voor het behandelen en voorkomen van infecties, ontstekingsziekten en kanker

Het vakgebied van de immunologie bestudeert hoe we omgaan met invasieve infectieuze uitdagingen die voortdurend aanwezig zijn in onze omgeving. Ook wordt bestudeerd hoe het immuunsysteem ontspoord kan raken, wat leidt tot auto-immuunziekten en allergieën. Verder wordt onderzocht hoe het immuunsysteem kan worden ingezet om ziekten zoals kanker te bestrijden met immuuntherapie.

Hoe werkt het immuunsysteem? Er zijn verschillende mechanismen die ons tegen ziekteverwekkers beschermen. De barrières van ons lichaam, bestaande uit de huid, de longen en het maag-darmstelsel, beschermen ons tegen een invasie. Maar als deze barrières doorbroken worden, reageren cellen die tot het aangeboren immuunsysteem behoren direct op het gevaar. Dit wordt gevolgd door cellen van het adaptieve immuunsysteem die worden geactiveerd. Deze cellen rijpen, vermenigvuldigen zich en, het belangrijkste, ze hebben het vermogen om zich het gevaar specifiek te herinneren, zodat ze direct kunnen reageren als ze in de toekomst aan hetzelfde gevaar worden blootgesteld.

In het algemeen kan worden gesteld dat cellen van het immuunsysteem aanwezig zijn in elk orgaan en dat lichaamsvloeistoffen zoals bloed en lymfe worden gebruikt als transportmiddel om de verschillende celtypen bijeen te brengen die nodig zijn om een immuunrespons te starten. Verschillende celtypen en verschillende organen voeren hun eigen taken uit, waarbij een effectieve en nauwkeurige communicatie heel erg belangrijk is. Het is belangrijk om te benoemen dat ieder persoon genetisch uniek is samengesteld. Dit bepaalt zijn of haar persoonlijke reactie ('nature'). Om alles nog ingewikkelder te maken, is deze reactie niet statisch en verandert deze tijdens het leven, afhankelijk van leeftijd en eerdere ervaringen ('nurture').

Diermodellen binnen de immunologie

Immunologen bestuderen door welke mechanismen het immuunsysteem zich ontwikkelt, welke verschillende celtypen er zijn en hoe deze in functioneel opzicht met elkaar verband houden. Vanuit een meer toegepast oogpunt, proberen immunologen om deze kennis in te zetten in de strijd tegen besmettelijke ziekten en kanker door het ontwikkelen van vaccins. Ook wordt getracht om auto-immuunziekten en allergieën te voorkomen of te genezen. Dit wordt gedaan door het immuunsysteem te herprogrammeren of door de gezonde balans te herstellen. Er zijn veel uitdagingen bij het onderzoeken van de menselijke immuunrespons in gezondheid en ziekte (zie tabel 1). Via diermodellen is ontzettend veel geleerd over immuunmechanismen en de pathogenese van ziekten.



Tijdens immunologisch onderzoek worden dieren of dierlijke producten voor verschillende doeleinden gebruikt. Dierlijke producten zoals antilichamen, serum, enzymen en matrigels zijn in elke immunologisch laboratorium te vinden als nuttige hulpmiddelen. Daarnaast zijn veel verschillende diermodellen ontwikkeld om (a) genen te identificeren of bestuderen die zijn betrokken bij de inductie en regulatie van de immuunresponsen, om (b) geneesmiddelen te bestuderen die zijn gericht op het moduleren of dempen van responsen, en als hulpmiddel voor (c) fundamenteel en (d) toegepast onderzoek en voor (e) preklinisch onderzoek. Dit soort onderzoek is belangrijk om inzicht te krijgen in infecties, vaccinatie, kanker en ontstekingsziekten. Met diermodellen is het ook mogelijk om orgaanspecifieke immuunprocessen te bestuderen en de wijze waarop deze worden beïnvloed voor systemische of orgaanspecifieke interventies. Daarnaast zijn verschillende modellen ontwikkeld om de (f) veiligheid en (g) werkzaamheid (correlaten van infectie) van klinische interventies te onderzoeken.

Voordelen en beperkingen van diermodellen

Er zijn talloze voordelen van immunologisch onderzoek met diermodellen. Dieren bezitten een volledig immuunsysteem, waardoor het mogelijk is systemische responsen (van bijvoorbeeld alle betrokken celtypen en antilichamen) in het verloop van de tijd te bestuderen. Dieren kunnen genetisch gemanipuleerd worden, er zijn specifieke beeldvormingstechnieken ontwikkeld en de kosten zijn relatief laag vergeleken met onderzoek bij mensen. Bovendien zijn de resultaten vaak zeer reproduceerbaar, omdat de meeste onderzoeken worden uitgevoerd bij dieren die genetisch identiek zijn. Er zijn echter ook ernstige beperkingen. Resultaten moeten worden geëxtrapoleerd naar mensen, wat niet altijd eenvoudig is, omdat bepaalde genetische componenten anders kunnen zijn of zelfs volledig afwezig zijn. Verder infecteren veel pathogenen uitsluitend mensen of primaten (hiv-1, SARS-CoV's, ebola) en moeten de meeste tumoren worden aangepast om ze geschikt te maken voor gebruik in het laboratorium. Het wordt nu algemeen aanvaard dat het immuunsysteem van dieren zoals muizen, maar ook dat van primaten, aanzienlijk verschilt van dat van mensen. Zo zijn bijvoorbeeld immuundeficiënte muizen nodig voor onderzoek van de genetische drift van humane tumoren en tumorimmunologie. Sommige primaatsoorten reageren zeer sterk op een hiv-infectie, terwijl andere soorten na infectie niet eens de ziekte ontwikkelen. En tot slot, maar niet minder belangrijk, vormt het feit dat de meeste onderzoeken worden uitgevoerd bij genetisch identieke proefdieren een belangrijke beperking. Zoals de recente

COVID-19-pandemie ons weer eens met de neus op de feiten heeft gedrukt, zijn individuele responsen sterk verschillend en van invloed op de pathogenese en uitkomst van de ziekte.

Behoeft aan humane modellen voor humane immunologie

Naast diermodellen zijn in vitro modellen zeer belangrijk geweest voor immunologisch onderzoek. Immuncellen kunnen relatief makkelijk geïsoleerd worden uit bloed om zo hun reactie op pathogenen of de omgeving te bestuderen. Met name in het afgelopen decennium zijn innovatieve technieken ontwikkeld die het mogelijk maken om op een zeer gedetailleerde wijze immuncellen bij patiënten of in cohortonderzoeken te bestuderen. Naar verwachting zullen deze technologieën zich verder verbeteren, waardoor het mogelijk is om het functioneren van het immuunsysteem bij vrijwilligers of patiënten te onderzoeken. Dit zal boeiende, nieuwe modellen opleveren waarmee humane immunologie meer en meer bij mensen kan worden onderzocht. Parallel daaraan is er enorme vooruitgang geboekt in de ontwikkeling van in vitro modellen voor de volgende generatie(s) immunologisch onderzoek. Humane celgebaseerde modellen, variërend van kweken met één celtype in een kweeschaal tot een complexe organoïdekweek in speciaal daarvoor ontwikkelde bioreactoren die de fysiologische omgeving van het orgaan in het menselijk lichaam nabootsen, zijn belangrijke aanjagers in de transitie naar het gebruik van NAM's^{8, 9, 10}. Het gebruik van 'Big data' wordt ook steeds belangrijker in onderzoek. In silico en computationele modellen verzamelen gegevens die afkomstig zijn van humaan onderzoek of van eerder uitgevoerd proefdieronderzoek en vullen de kennissgaten met nieuwe gegevens uit in vitro onderzoek. Dit helpt om de werkzaamheid van geneesmiddelen en stoffen waaraan mensen worden

⁸ Anklam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, et al. Emerging technologies and their impact on regulatory science. *Exp Biol Med.* 2022;247(1):1-75.

⁹ Marx U, Akabane T, Andersson TB, Baker E, Beilmann M, Beken S, et al. Biology- Inspired Microphysiological Systems to Advance Patient Benefit and Animal Welfare in Drug Development. *Altex-Altern Anim Ex.* 2020;37(3):365-94.

¹⁰ Franzen N, van Harten WH, Retèl VP, Loskill P, van den Eijnden-van Raaij J, IJzerman M. Impact of organ-on-a-chip technology on pharmaceutical R&D costs. *Drug Discov Today.* 2019;24(9):1720-4.



blootgesteld te voorspellen en om nieuwe aanknopingspunten voor geneesmiddelenonderzoek te vinden en, daaruit voortvloeiend, nieuwe geneesmiddelen te ontwikkelen.

Voor het maken van een routekaart^{11, 12} is een logische, niet-uitputtende, inventarisatie gemaakt van beschikbare modellen en NAM's (zie hieronder en in tabel 2). Hierin zijn waar mogelijk en waar van toepassing aanbevelingen gedaan. Onze vervolgstap is om te analyseren wat er nodig is om de transitie een impuls te geven, waaronder een analyse van de barrières die er (soms wereldwijd) bestaan. Tot slot wordt een toekomstbeeld geschetst van immunologisch onderzoek en innovaties in NAM's. Samen vormt dit een 'streefbeeld' voor het vakgebied van de immunologie.

Tabel 1. Uitdagingen bij het modelleren van humane immuunresponsen

Complexiteit van het systeem ¹	
Verschillende celtypen	Macrofagen, monocyten, dendritische cellen, lokale antigeen-presenterende cellen, T cellen, B cellen, granulocyten, NK cellen
Verschillende organen	Bloed, lymfeklieren, thymus, beenmerg, alle andere organen
Verschillende processen	Migratie, extravasatie, fagocytose, antigeenpresentatie, differentiatie, rijping, immuunresponsen
Lange tijdlijnen	Het ontwikkelen van een volledige immuunrespons kan tot 6 weken duren
Complexe pathologie	Compensatiemechanismen, onbalans, schade en reparatie
Complexiteit van de populatie	
Verschillende genen ('nature')	Grote variabiliteit tussen donoren met een sterke invloed op de immuniteit
Verschillende omstandigheden ('nurture')	Veroudering, geslacht, microbiota, omgeving

'Bij diermodellen en NAM's moet rekening worden gehouden met de complexiteit van immuunresponsen bij mensen. Hoewel diermodellen relatief goed presteren bij het modelleren van de 'complexiteit van het systeem' (ondanks dat er veel verschillen bestaan tussen immuunreacties bij dieren en bij mensen), presteren ze slecht bij het modelleren van de 'complexiteit van de populatie'. In tegenstelling daarmee presteren de huidige NAM's slecht op de complexiteit van het systeem, maar zijn ze in staat om de complexiteit van de populatie te modelleren door variaties tussen donoren en genetische verschillen. Zowel bij dieronderzoek als bij NAM's is translatie en extrapolatie naar het levende menselijke individu nodig.

¹¹ Mastrangeli M, Millet S, Mummery C, Loskill P, Braeken D, Eberle W, et al. Building Blocks for a European Organ-on-Chip Roadmap. *Altex-Altern Anim Ex.* 2019;36(3):481-92.

¹² Mastrangeli M, Millet S, Braeken D, Eberle W, Fernandez L, Gidrol X, et al. Organ-on-Chip in Development: Towards a Roadmap for Organs-on-Chip. *Altex-Altern Anim Ex.* 2019;36(4):650-68.



3.

New Approach Models op verschillende niveaus van complexiteit

De complexe pathologie die gepaard gaat met dynamische, systemische responsen is misschien wel de belangrijkste reden dat immunologen de voorkeur geven aan het gebruik van dieronderzoek boven NAM's. Hoewel het bij dieronderzoek inderdaad mogelijk is om onverwachte effecten te analyseren, vormt het ook een 'statische black box-benadering'. Dit ontstaat wanneer het gebruikte model niet is gericht op het verkrijgen van inzicht in de onderliggende mechanismen bij mensen, maar zich in plaats daarvan blijft richten op het analyseren van het 'algehele' effect. Wanneer de veroorzaker van een ziekte bekend is (bijv. bij infectieziekten) kan dieronderzoek vrij betrouwbare informatie geven over pathobiologie en mogelijke beschermende effecten van immuunresponsen. Hoe minder bekend is over de precieze oorzaak van de ziekte (zoals bijvoorbeeld het geval is voor veel auto-immuunziekten bij mensen), of hoe langer en complexer de pathologie is (bijvoorbeeld bij tumorimmunologie), hoe minder voorspellend diermodellen worden. De resultaten worden dan afhankelijker van de manier waarop deze modellen worden geïnduceerd en welke muizenstam wordt gebruikt. Er bestaan veel diermodellen voor onderzoek naar immunologische ziekten en veel daarvan hebben te maken met diepgaande problemen ten aanzien van reproduceerbaarheid en translatie. We zullen kritischer moeten zijn over het gebruik van proefdieren als relevante modellen voor ziekten bij mensen en overwegen of de specifieke - pathologische - processen die een rol spelen niet beter kunnen worden gemodelleerd met NAM's. Het is daarom belangrijk dat instellingen een gespecialiseerde centrale NAMfaciliteit hebben of toegang hebben tot NAM-onderzoek om de keuze voor het beste model te faciliteren. Toegang tot diermodellen via de proefdierfaciliteiten en het gebrek aan toegang tot NAM's verhoogt het gebruik van diermodellen, hoewel het model misschien minder geschikt is voor het beantwoorden van de vraag.

De weg vooruit zal moeizaam en traag zijn, maar is onvermijdelijk. De 'black-box-benadering' kan worden afgebroken door **parallelstudies uit te voeren** waarin onderzoekers die in vivo experimenten uitvoeren worden gefaciliteerd om tegelijkertijd in vitro onderzoek uit te voeren voor vergelijkende en analytische doeleinden. Daarnaast maakt een groter **inzicht in de translationele hiaten** tussen diermodellen en de ziekte die wordt gemodelleerd het mogelijk om betere keuzes te maken over de kwalificatie



van het diermodel^{13,14}. Als diermodellen er niet in zijn geslaagd om responsen bij mensen te voorspellen, zal inzicht in de onderliggende humane mechanismen helpen bij de implementatie van NAM's.

NAM-tools en -modellen moeten zo eenvoudig mogelijk zijn, maar zo complex als nodig is om onderzoeksvragen te beantwoorden met valide relevantie voor mensen. Een grotere complexiteit houdt direct verband met de fysiologische relevantie, maar geeft ook een gecompliceerde kweeklogistiek en lagere doorlooptijd (zie tabel 2).

Tabel 2: De New Approach Methods (NAM) toolbox

Soort model (doorlooptijd)	Definitie	Voorbeeld	Voor- en nadelen
In silico (hoog)	Computationale modellering, computersimulaties, bioinformatica	<ul style="list-style-type: none"> Analyse van complexe processen 3D-computer-modellen Analyse van menselijk genoom Geneesmiddel-ontdekking: tuberculose 	<p>Maakt het mogelijk om een grote hoeveelheid gegevens uit verschillende onderzoeken op te nemen in een enkel model.</p> <p>Er zijn gegevens nodig van <i>in vitro</i> en <i>in vivo</i> modellen om het model te ontwikkelen en valideren</p>

Soort model (doorlooptijd)	Definitie	Voorbeeld	Voor- en nadelen
<i>In vitro</i> celgebaseerde assays (hoge tot lage doorlooptijd bij toenemende complexiteit)	Celgebaseerd onderzoek wordt buiten het levende organisme uitgevoerd, meestal in reageerbuisjes, celkweekschalen en bioreactoren	<ul style="list-style-type: none"> Eenvoudige, conventionele 2D-celkweek 3D-sferoïdekweek met een enkel celtyp 3D organotypische kweek met meerdere celtypen die een schaalbare eenheid van een orgaan vormen 3D multi-orgaan-modellen die een representatie zijn van interacties tussen organen, zoals systemische (immuun) toxiciteit, tumormetastaseren, biodistributie van geneesmiddelen 	<p>Modellen moeten zo eenvoudig mogelijk zijn, maar zo complex als nodig is om onderzoeksvragen te beantwoorden. Geeft informatie die relevant is voor humane immunologie en signaleringsroutes. Heeft <i>in vitro</i> - <i>in vivo</i> correlaties nodig om informatie te verkrijgen die relevant is voor mensen</p>
<i>In vivo</i> humaan onderzoek (laag)	Onderzoek met levende mensen	<ul style="list-style-type: none"> Observationeel onderzoek Interventie-onderzoek <ul style="list-style-type: none"> Deel van reguliere behandeling Aanvullende interventie 	<p>Geeft informatie die rechtstreeks relevant is voor mensen. Onderzoek moet ethisch verantwoord zijn, uitgebreide logistiek rond inclusie en documentatie, en grote aantallen patiënten</p>

¹³ Pound P, Ram R. Are researchers moving away from animal models as a result of poor clinical translation in the field of stroke? An analysis of opinion papers. *BMJ Open Sci.* 2020;4(1):e100041.

¹⁴ Roep BO, Atkinson M, von Herrath M. Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(12):989-97.



In vitro modellen

Voor het bestuderen van de verschillende celtypen die zijn betrokken bij de menselijke immuunrespons, is de eenvoudigste benadering het gebruik van **in vitro 2D-modellen** die bestaan uit monoculturen van humane cellijnen of humane primaire cellen. Deze zijn gemakkelijk te gebruiken en manipuleren. In cellijnen is de reproduceerbaarheid zeer hoog door de gestandaardiseerde kweekomstandigheden en het gebrek aan variatie tussen donoren. Variatie tussen donoren is echter ook van belang, omdat het een afspiegeling is van de responsen van individuen als deel van de populatie. Daarnaast is genetische drift van cellijnen, die gepaard gaat met lange kweektijden, een nadeel. Het gebruik van primaire cellen is een afspiegeling van de natuurlijke variabiliteit tussen donoren en dit biedt meer inzicht in de natuurlijke variatie in immunologisch processen zoals immuunactivatie, aangeboren respons en adaptieve respons. Celweekmodellen maken het mogelijk om een licht te werpen op moleculaire mechanismen door middel van genetische manipulaties, screening en standaard uitlezingen.

Met **eenvoudige co-cultuurmodellen** is het mogelijk om de interacties tussen cellen te onderzoeken. Gecombineerd met verdere experimentele manipulaties biedt het mogelijkheden om mechanismen te onderzoeken die ten grondslag liggen aan communicatie tussen cellen, zoals de initiatie van adaptieve immuunresponsen en cytolytische responsen. Voor deze modellen is toegang nodig tot primair weefsel (cellen, weefsel), waarbij ethische goedkeuring en biobanking van belang zijn. Er zijn complexere modellen nodig voor het onderzoeken van intercellulaire communicatie in verschillende organen.

Ex vivo weefselkweekmodellen bestaan uit levende, hele weefsels en organoïde coupes waarmee de immunologische processen tijdens infecties en ontstekingen bestudeerd kunnen worden. Nog meer dan het geval is bij primaire cellen, is voor het gebruik van weefsels goede toegang tot weefsels van belang. Ook hier is de goedkeuring van ethische commissies een belangrijke voorwaarde. Dit is beter haalbaar in een UMC-setting dan binnen een universiteit of instelling. Vital Tissue (www.vitaltissue.nl) is een nieuw initiatief dat is gericht op het overbruggen van de kloof tussen de perifere ziekenhuizen en onderzoekers, om te zorgen dat onderzoekslaboratoria worden voorzien van chirurgisch restmateriaal. Dit zal zorgen voor een regelmatig aanbod van ex vivo weefsel aan de onderzoekslaboratoria die vervolgens de verschillende primaire celtypen kunnen isoleren die nodig zijn in NAM's.

Organoïde kweken zijn kweekmodellen die nog geavanceerder zijn. Hiervoor zijn aanvullende technische kennis en specifieke materialen nodig, maar ze bieden ook mogelijkheden om interacties tussen immuuncellen te bestuderen, zoals migratie binnen 3D-gekweekte **miniaturorganen (organoïden)**. Bij deze geavanceerde kweken zijn vaak primaire cellen en stamcellen betrokken die zijn gezaaid in een scaffold, als representatie van de extracellulaire weefselomgeving van het orgaan. Deze kweken kunnen vaak vele maanden levensvatbaar blijven. Zo kan bijvoorbeeld een celweek in een 96-wells microplaat in theorie worden gebruikt om menselijke immuunresponsen van 96 verschillende donoren na te bootsen. Dit kan gedaan worden door elke well een verschillende micro-omgeving te geven en cell populaties in deze afzonderlijke micro-omgevingen te bestuderen. **Organs-on-a-chip** bieden momenteel de meest complexe en geavanceerde vorm van celweek. Organoïden worden gekweekt in bioreactoren die de omgeving van het menselijk lichaam nabootsen. Microfluidica bootsen bloedvoorziening, zuurstofniveaus en drukgradiënten na. Geïntegreerde stroomcircuits en sensoren (chip) simuleren de activiteiten en mechanica van organen. Door al deze elementen kan de organoïd een afspiegeling zijn van de menselijke fysiologie.

In vivo onderzoeken bij mensen

In vivo studies bij mensen maken het mogelijk de ziekte zelf, en de immunologische processen die hierbij zijn betrokken, rechtstreeks te bestuderen bij levende mensen. Dit is uiterst nuttig om inzicht te krijgen in ontstekingen, om immuunresponsen op bijvoorbeeld infecties te bestuderen en om nieuwe interventies te testen (bijvoorbeeld vaccinatiestrategieën). Maar voor dergelijke studies is medische ondersteuning en een strenge ethische evaluatie noodzakelijk. Daarnaast zijn de opties voor manipulatie beperkt. Met name door innovatieve technologische vooruitgang in analytische analysemethoden is het tegenwoordig mogelijk om steeds uitgebreidere en gevoeligere analyses uit te voeren op het niveau van genen, eiwitten en metabool. Hierdoor zal naar verwachting het aantal in vivo studies bij mensen toenemen. Een belangrijk onderdeel is om te bepalen hoe veilig een geneesmiddel of behandeling is. Gewoonlijk wordt dit gedaan in dieronderzoek. Maar er zijn andere opties beschikbaar. Hoewel de opties voor manipulatie op dit moment beperkt zijn, zullen deze in de loop van de tijd ook verder worden verbeterd, zoals blijkt uit de fase 0- of microdoseringsonderzoeken. Bij deze studies worden



zeer kleine hoeveelheden van het geneesmiddel toegediend en de effecten worden na toediening *in vivo* bestudeerd. Als gevolg hiervan kunnen veiligheidsstudies voor bijvoorbeeld antilichaam-gelabelde biologicals of biosimilars in dieren worden vervangen door microdoseringsonderzoek bij mensen. Daarnaast zijn onderzoeken met menselijke vrijwilligers zoals vaccinatie- of challenge-studies met virussen of allergenen zeer doeltreffend voor het bestuderen van specifieke interventies of effecten en hebben ze een uitstekend voorspellend vermogen.

Tot slot zijn *in silico* studies die gegevens uit cohorten of patiëntgegevens gebruiken in combinatie met gegevens uit *in vitro/ex vivo* onderzoek zeer waardevol. Ze kunnen belangrijke immunologische informatie opleveren over immuunpathogenese, werkzaamheid van de behandeling, veiligheid en moleculaire mechanismen (bijvoorbeeld door het bestuderen van genpolymorfismen).



4.

Innovaties in NAM's in de nabije toekomst

In vitro modellen

Innovatie van *in vitro* modellen zal deels haalbaar zijn door toegenomen technologische mogelijkheden. Voortschrijdende kennis over kweekmethoden in het algemeen, ook wat betreft kweekmethoden voor primaire cellen, zal deze haalbaarheid verder vergroten. Verder moet bijzondere aandacht worden gegeven aan het gebruik van producten van dierlijke oorsprong in celkweken.

Dierlijke producten

Veel NAM's zijn afhankelijk van het gebruik van producten die afkomstig of geogst zijn van dieren. Het wijdverbreide gebruik van foetaal runder- en kalfsserum en van matrigels gaat gepaard met ernstige ethische en wetenschappelijke nadelen (zie tabel 3)^{15, 16}. Er zijn veel alternatieven voor deze dierlijke producten, maar uitgebreide testen en zichtbaarheid van resultaten maken dat de invoering en implementatie zeer traag verlopen. Onderzoekers zijn terughoudend in het veranderen van werkmodellen en implementatie kost tijd en geld. Bovendien zijn deze alternatieven vaak duurder. Een duidelijke stimulering van niet-dierlijke producten en specifieke financieringsmogelijkheden of programma's om producten naast elkaar te vergelijken zou zeker helpen bij de implementatie. Hierdoor zal de vervanging van dierlijke producten in celkweken in de praktijk versnellen. Nationale en internationale regelgeving biedt meer richtlijnen voor het gebruik van niet-dierlijke producten en diervrije methoden [ESAC opinion scientific validity of replacements for animal-derived antibodies].^{17, 18, 20} Een specifieke subcategorie van dierlijke producten is het gebruik van antilichamen. Deze moleculaire tools worden niet alleen gebruikt in immunologisch onderzoek, maar spelen ook een belangrijke rol in veel celbiologische toepassingen in alle vakgebieden binnen de life-sciences. Daarnaast maken veel innovatieve behandelingen gebruik van

¹⁵ Sebastian Eggert JW, Jessica Rosolowski & Tilo Weber. Practical Workshop on Replacing Fetal Bovine Serum (FBS) in Life Science Research: From Theory into Practice. ALTEX; 2022.

¹⁶ Kozłowski MT, Crook CJ, Ku HT. Towards organoid culture without Matrigel. Commun Biol. 2021;4(1).

¹⁷ Bradbury ARM, Dubel S, Knappik A, Pluckthun A. Animal- versus in vitro-derived antibodies: avoiding the extremes. Mabs-Austin. 2021;13(1)

¹⁸ Barroso J. Scientific Validity of Replacements for Animal-Derived Antibodies. Washington, D.C., USA: SACATM Meeting; 2019.



biologicals die bestaan uit gemodificeerde antilichamen die zich richten op specifieke factoren bij de gastheer die ziekte veroorzaken. Momenteel bestaat het standaard en eenvoudigste protocol voor het verkrijgen van antilichamen tegen een specifiek antigeen, uit het injecteren van dieren met dit antigeen dat is opgenomen in een adjuvans. Dit protocol lijkt sterk op de vaccinatiemethode gebruikt bij mensen.

Het genereren van antilichamen heeft veranderingen ondergaan door innovaties, maar ook door strikte regelgeving over het gebruik van Freund volledig adjuvans en uit ascites gewonnen antilichamen. Door deze regelgeving is het gebruik van deze methoden, en het daarmee gepaarde ongerief bij dieren, afgenomen. Het is interessant om te zien dat deze regelgeving geen negatieve gevolgen heeft gehad voor de productie van antilichamen, omdat het werkveld hierdoor gedwongen werd om betere alternatieven te ontwikkelen. Een interessante technologische vooruitgang is de ontwikkeling van de faagdisplay-techniek als vervangingsmogelijkheid voor antilichamen die uit dieren worden gewonnen. In een recent rapport heeft het European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) de EU geadviseerd om alternatieven te ontwikkelen om het gebruik van antilichamen die worden gewonnen uit dieren uit te faseren en op termijn te verbieden. Het ECVAM adviseert om in plaats daarvan antilichamen te gebruiken die worden gewonnen via de faagdisplaymethodiek¹⁹, ²⁰. Maar het is nog niet duidelijk of antilichamen die worden gewonnen uit dieren volledig vervangen kunnen worden door faagdisplay. Dit komt omdat met de faagdisplaytechniek affiniteitsrijping ontbreekt en daardoor deze antilichamen een inherent kleinere theoretische diversiteit hebben dan antilichamen die afkomstig zijn uit dieren. Betrouwbare data waarin deze twee technieken naast elkaar worden gebruikt is momenteel niet beschikbaar. Dit zou een belangrijk hulpmiddel zijn bij besluitvorming door zowel onderzoekers als ethische commissies, onafhankelijk van de uitkomst van deze data.

Tabel 3: Voordelen en nadelen van het gebruik van dierlijke producten voor in vitro modellen

Dierlijk product	Voordelen	Nadelen	Vervangingsmogelijkheden
Foetaal kalfsserum/ foetaal runderserum	Ondersteunt adherentie Ondersteunt overleving Ondersteunt proliferatie	Inherent onlogisch Twijfelachtige fysiologische relevantie Gaat gepaard met ongerief bij dieren tijdens productie Gebruik van product van verschillende diersoorten Slecht gedefinieerde samenstelling Oorsprong vaak onduidelijk Variabiliteit tussen batches Veiligheidsproblemen kunnen klinische toepassing belemmeren	Chemisch gedefinieerd serumvrij medium (beschikbaar of in ontwikkeling voor kweek van veel verschillende celtypen) Supplementen (bijv. bloedplaatjes lysaat) Humaan poolserum
Matrigel (afkomstig van muizen)	Ondersteunt adherentie Ondersteunt overleving Ondersteunt instandhouding van gedifferentieerde cellen	Gaat gepaard met ongerief bij dieren tijdens productie Gebruik van product van verschillende diersoorten Variabiliteit tussen batches Kosten (duur)	Plantaardige hydrogels BioSilks Synthetische biomaterialen en scaffolds

¹⁹ Bradbury ARM, Dübel S, Knappik A, Plückthun A. Animal- versus in vitro-derived antibodies: avoiding the extremes. *Mabs-Austin*. 2021;13(1).

²⁰ Luechtefeld T, Hartung T. Computational Approaches to Chemical Hazard Assessment. *Altex-Altern Anim Ex*. 2017;34(4):459-78.



Antilichamen van dierlijke oorsprong	Affiniteitsrijping Relatief lage kosten	Gaat gepaard met enige mate van ongerief bij dieren tijdens productie Lange tijdlijnen	Faagdisplay-technologie Directe kloneringsprotocollen vormen humane antilichamen (voor enkele specifieke doeleinden), recombinante technieken
--------------------------------------	--	---	--

Daarnaast worden in immunologisch onderzoek eenvoudige co-cultuursystemen gebruikt voor het regelen van immuunactivatie, celdifferentiatie en antigeenpresentatie. Dat laatste hangt af van MHC-compatibiliteit, wat een flinke uitdaging kan vormen. Maar identificatie van antigeenspecifieke T-celreceptoren en B-celreceptoren biedt mogelijk ruimte voor genetische manipulatie. Sterker nog, er zijn al innovatieve technieken beschikbaar voor het onderzoeken van moleculaire en cellulaire processen in complexe celkweken en weefsels. Deze zullen naar verwachting verder worden ontwikkeld in de nabije toekomst. Hierdoor wordt meer moleculair onderzoek mogelijk, maar het vraagstuk van hele weefsels en systemische responsen binnen de immunologie zal een uitdaging blijven vormen.

De grote vraag is: **is het nodig om een geheel menselijk wezen tot in detail na te bootsen in een enkel model?** Of zijn goed afgebakende en gestandaardiseerde fysiologische representaties van de belangrijkste (multi)organen en voorvallen voldoende?^{21, 22} Deze gestandaardiseerde representaties hebben het bijkomende voordeel dat ze later tot in het grootste detail kunnen worden onderzocht, in tegenstelling tot een intact levend wezen waarin experimentele bevindingen vaak door vele onbekende factoren worden beïnvloed en daardoor niet eenduidig zijn.

Er zijn verschillende interdisciplinaire samenwerkingen ontstaan tussen immunologen, biomedische wetenschappers, technici, artsen en partners uit het

²¹ Marx U, Akabane T, Andersson TB, Baker E, Beilmann M, Beken S, et al. Biology- Inspired Microphysiological Systems to Advance Patient Benefit and Animal Welfare in Drug Development. *Altex-Altern Anim Ex.* 2020;37(3):365-94.

²² Luechtefeld T, Hartung T. Computational Approaches to Chemical Hazard Assessment. *Altex-Altern Anim Ex.* 2017;34(4):459-78.

bedrijfsleven om **modellen te ontwikkelen die een afspiegeling zijn van voorvallen is in het menselijk immuunsysteem**. Grote consortiumprojecten worden gefinancierd om het mogelijk te maken om binnen de komende 5 jaar realistische doelen te behalen. Voorbeelden hiervan zijn projecten die door de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek worden gefinancierd binnen het onderzoeksprogramma NWA-ORC: The Virtual Human Platform for safety assessment (NWO-projectnummer 1292.19.272); het LymphChip-project dat als doel heeft om lymfevaten te integreren die barrière-organoïden verbinden met lymfeklieren binnen organ-on-chip bioreactoren, zodat deze platformen kunnen worden ingezet als een precisie-instrument in de strijd tegen immuungerelateerde ziekten (NWO-projectnummer 1292.19.019); en het TTW Perspectiefproject SMART Organ-on-Chip: Standardized open Modular Approach to Recapitulate Tissues waarin functionaliteit wordt aangetoond door het induceren van weefselontsteking en testen van geneesmiddelen, en het door NWO gefinancierde project Body Barriers dat als doel heeft om een organ-on-chip platform te ontwikkelen dat het functioneren van twee van de belangrijkste barrières in ons lichaam na kan bootsen (d.w.z. slijmvlies-bloed- en bloed-hersenbarrière). Daarnaast tracht het Body Barriers project om te komen tot Proof of Concept (POC) testen met medische (dentale) hulpmiddelen en neuro-inflammatoire aandoeningen.

Verbeteringen voor de nabije toekomst

- Co-cultuurmodellen
 - combinaties van verschillende (immuun)cellen
 - multi-orgaancombinaties
 - integratie van bloed- en lymfevaten die circulerende immuuncellen bevatten
 - langere levensduur van kweken
 - gezondheids- en ziektemodellen
- Vervanging van producten van dierlijke oorsprong in celkweken
- Makkelijkere genetische manipulatie van primaire cellen en weefsels
- Bioreactoren/chips voor kweken om micro-omgevingen en fysiologische stimuli na te bootsen
- Integratie van sensoren, beeldvorming in realtime, immunofluorescentie microscopie, multiplexe analyse van kleine monsters



In vivo onderzoeken bij mensen

De levende mens zal altijd het beste model zijn om immuungemedieerde ziekten bij mensen te onderzoeken en begrijpen. Dergelijke onderzoeken kunnen plaatsvinden in de vorm van observationele studies, waarbij restmateriaal van routinematig diagnostische onderzoek wordt gebruikt en dat geen extra last voor de betrokken patiënt met zich meebrengt, of in de vorm van interventiestudies die moeten voldoen aan zeer strenge ethische en veiligheidsrichtlijnen. Op dit moment vormen ethische beperkingen en bureaucratische ethische commissies een groot obstakel voor het opzetten van studies met patiënten en vrijwilligers.

Een betere standaardisatie van klinische protocollen en beoordelingsprocessen zou goedkeuring faciliteren. Met meer betrokkenheid van patiënten, wordt het ook belangrijk om complexere studies met patiënten of vrijwilligers op te zetten. Veiligheid staat bovenaan, maar die wordt vaak bepaald met diermodellen. Nieuwe methoden om de veiligheid te onderzoeken, zoals microdosering of validatie met in vitro testen moeten worden geïmplementeerd en worden geaccepteerd door de ethische toetsingscommissies. Alternatieve methoden voor veiligheidsbeoordeling zonder betrokkenheid van dieren zou de norm moeten worden.

Systemische responsen zijn notoir moeilijk om te modelleren in celweeke modellen (Ab-responsen, TCR/BCR-repertoire, chronische infecties/ziekte). Voor deze doeleinden is cohortonderzoek heel geschikt. Geavanceerde, innovatieve, gevoelige, high throughput-analyses gecombineerd met bioinformatica zijn essentieel om in vivo immunologische processen te begrijpen en deze te bestuderen. Kennis over genetische variaties maakt het bestuderen van specifieke genen in mensen beter haalbaar. Dit kan gedaan worden in combinatie met zowel cohort- en vrijwilligersonderzoek als in vitro onderzoeken.

Gevoeligere en goedkopere high throughput-analyses (NGS, metabolomics, proteomics, lipidomics, multiplex assays) zullen belangrijk zijn in onderzoeken met patiëntcohorten en met vrijwilligers. Dit kan in combinatie met minimaal invasieve monsternamen opgezet worden.

Verbeteringen voor de nabije toekomst

- Standaardiseren en vereenvoudigen van klinische protocollen en beoordelingsprocessen
- Genereren van meer high throughput-methoden (NGS, proteomics, glycomics, multiplexanalyse) voor immunologische processen in mensen (patiënten, vrijwilligers).
- Niet-invasieve beeldvormingstechnieken, bijv. optische coherentietomografie (OCT)
- Open access en herbruikbare data
- Verdere ontwikkelingen voor het genereren van antilichamen zonder betrokkenheid van dieren (bijv. faagdisplay)
- Health RI: Data Driven Health: verbinden, delen en hergebruiken
- • Fase 0-studies/microdosering



5.

Transitiedoel

Hoewel het een flinke uitdaging is, is het haalbaar om in de komende 10 jaar de transitie te maken naar NAM's als het dominante model voor het bestuderen van immunologie. De exponentiële groei van nieuwe en innovatieve NAM's zal zich in de komende 10 jaar voortzetten en ze zullen steeds belangrijker worden en breder worden geïmplementeerd. Voor het bereiken van dit doel moeten investeringen worden gedaan. Voor enkele van deze investering zal nog een flinke inspanning geleverd moeten worden, terwijl andere al plaatsvinden.

In uitvoering

- Verder ontwikkelen van centrale faciliteiten voor organoïden en iPSC's en tegelijkertijd langzaam inkrimpen van proefdierfaciliteiten
- Ontwikkeling van innovatieve NAM's
- Bredere toegang tot data van cohorten en patiënten
- Parallelstudies om bruikbaarheid van diermodellen en NAM's in kaart te brengen. Dit zou moeten bestaan uit parallelstudies van NAM's met zowel proefdieronderzoek als humaan onderzoek
- Verzamelen van big data en ontwikkelen van computationele modellen
- Projecten waarin NAM's gebruikt worden financieel 'belonen'
- Vorming van lokale TPI's om de transitie naar NAM's te faciliteren

Regelgeving en cultuurveranderingen

- Verminderen van administratieve hordes en faciliteren van toegang tot humaan materiaal voor onderzoek
- Faciliteren van match-making websites en workshops (NVI kan hier bijvoorbeeld een rol in spelen)
- Vragen om duidelijk bewijs voor de relevantie van proefdieronderzoek in voorstellen door AWB/DEC/CCD en projectfinanciers. Zo nodig vragen om literatuurreviews of actuele gegevens over de ondoelmatigheid van NAM's.
- Faciliteren van contacten tussen lokale TPI's en AWB/DEC/CCD om bewustzijn te vergroten en transitie te stimuleren



- Er zijn meer investeringen nodig voor het opzetten van netwerken en organoïdcentra. Deze kunnen dienen om wetenschappers kennis te laten maken met en op te leiden in organoïdkweek en daarnaast dit werkveld exponentieel uit te breiden. Ook moeten, in aanvulling op parallelstudies zoals hieronder genoemd, transitieworkshops worden gestimuleerd. In deze workshops kunnen wetenschappers die momenteel met diermethoden werken, en de transitie naar NAM's willen maken, kennismaken met diervrije methoden en netwerken. Op deze wijze kunnen ze hun onderzoek kunnen blijven uitvoeren, maar dan zonder het gebruik van proefdieren (zie www.helppathonhotel.org).

Dit is in het bijzonder relevant voor wetenschappers die aan het begin van hun loopbaan staan (promovendi en postdocs). Het is ook zeer belangrijk om bestaande innovatieve methoden op het gebied van celbiologie en immunologie op te nemen in het universitaire onderwijssysteem, waaronder BSc-, MSc- en PhD-opleidingsprogramma's. Deze jonge wetenschappers zijn namelijk de immunologen en biomedische wetenschappers van de toekomst. Het gebruik van proefdierrijke methoden zou als standaard opgenomen moeten worden in het programma van NVVI-bijeenkomsten in plaats van de huidige bias naar het presenteren van dierstudies.

Parallelstudies moeten worden gestart om onderzoekers die proefdiermethoden gebruiken te stimuleren om samen te werken met onderzoekers die NAM's gebruiken en ontwikkelen. Hierdoor kan worden vastgesteld welke belemmeringen er zijn, om zo de haalbaarheid te bepalen en de transitie te ondersteunen van onderzoekers die nog proefdiermethoden gebruiken. Parallelstudies stellen proefdieronderzoekers in staat om te onderzoeken of diermodellen daadwerkelijk het beste model zijn, of dat deze vervangen kunnen worden door NAM's. Dit creëert bewustzijn en zorgt ervoor dat onderzoekers die met proefdieren werken het gevoel krijgen dat ze deel uitmaken van de oplossing, in plaats van het probleem te zijn. Dit sluit ook aan op EU-regelgeving waarin staat dat dieren alleen mogen worden gebruikt voor onderzoek wanneer hier een overtuigende wetenschappelijke verantwoording voor is; wanneer de verwachte baten opwegen tegen de schade die de dieren ondervinden; en wanneer de doelen niet behaald kunnen worden met proefdierrijke, alternatieve methoden (zie de EU-richtlijn 2010/63/EU, gewijzigd in 2019 en de Wet op de Dierproeven, WoD 2014, die gebaseerd is op EU-regelgeving). Als de NAM ten

opzichte van het diermodel minstens in dezelfde mate voldoet, dan moet toekomstig onderzoek gebruik maken van dit nieuwe model en moet overdracht van deze technologieën worden geïnitieerd. Regelgevende instanties (EMA/FDA) zullen NAM's accepteren als het gebruik ervan wetenschappelijk wordt ondersteund en er data verstrekt kunnen worden die de veiligheid en werkzaamheid onderschrijven. Binnen universiteiten moet meer bewustzijn en begeleiding komen over dit onderwerp. In een vroeg stadium van de opzet van het onderzoek zou contact moeten worden gelegd met de afdeling 'wetenschappelijk advies' van de EMA/FDA. Het contact kan worden gebruikt om te bespreken wat er nodig is voor toelating in de toekomst en om mogelijke barrières te beslechten die opgeworpen kunnen worden door het gebruik van NAM's.

Samenwerking met het nationale consortium human organ and disease Model Technologies (hDMT) biedt immunologen de mogelijkheid om in een interdisciplinaire omgeving samen te werken met celbiologen, (weefsel)ingenieurs en het bedrijfsleven. Deze samenwerking stimuleert het verder ontwikkelen van modellen en ondersteunt de implementatie.

Sommige onderzoeksgebieden binnen de immunologie zullen de transitie sneller kunnen maken dan andere. Dit is afhankelijk van de urgentie, de transitievereisten en beschikbare expertise. Een van de doelen zou daarom moeten zijn om expertise te vergroten en deze expertise voor innovatieve modellen beschikbaar te maken voor elke onderzoeker. Voorbeelden hiervan zijn het iPSC-hotel en organoïdcentra die zijn of worden opgezet in veel universiteiten. Een belangrijke voorwaarde om de slagingskans te vergroten is het delen van technologieën en kennis. Aanvaarding door de belanghebbenden, waaronder beleidsmakers en de gemeenschap (wetenschappelijke tijdschriften, dierproevencommissies, vakgenoten). Aanvaarding door belanghebbenden wordt momenteel onder de aandacht gebracht. Vaak is kennis over alternatieven niet eenvoudig beschikbaar voor de ethische commissies binnen instellingen. Dit kan worden verbeterd door meer te integreren met de lokale TPI-initiatieven binnen de universiteiten. Verder kunnen deze lokale TPI's direct contact leggen met de AWB/DEC/CCD, bij voorkeur door een DEC-lid op te nemen in het managementteam. Op die manier worden bewustzijn en transitie optimaal gefaciliteerd.



Het gebruik van proefdieren zou zowel door instellingen als door onderzoekers kritischer moeten worden beoordeeld. Momenteel bepaalt de onderzoeker of het experiment moet worden uitgevoerd met een proefdier en beoordeelt de AWB/DEC/CCD de schade die aan de dieren wordt berokkend. AWB/DEC/CCD hebben ook kennis over NAM's en kunnen onderzoekers helpen met alternatieven. Naast de punten die hierboven al genoemd worden, zou het verplicht moeten worden dat onderzoekers bewijs aanleveren (uit literatuur of onderzoeksdata) dat experimenten met proefdieren noodzakelijk zijn en dat NAM's niet voldoen. Dit maakt het mogelijk om de aanvragen kritischer te beoordelen, zonder dat dit meer tijd vraagt van de AWB/DEC/CCD.

De **vijfjarendoelstelling** zou zijn om te investeren in onderwijs en training van jonge onderzoekers binnen universiteiten, UMC's en instellingen, omdat hiermee een cultuuromslag mogelijk wordt en dit de transitie versnelt. De NVVI kan hier een belangrijke rol in spelen door cursusmateriaal, workshops en docenten te bieden. Verder moet de aandacht liggen op het ontwikkelen van immuuncompetente modellen, gefocust op modellen van enkele organen en twee gecombineerde organen. Daarnaast zou de aandacht moeten uitgaan naar het opzetten van methoden voor multi-organmodellen zonder immuunsysteem. Om dit doel te bereiken moet het aanbod van ex vivo weefsels voor onderzoekers worden gefaciliteerd (inclusief bloed). Een ander belangrijk aandachtspunt is om te investeren in het verzamelen van patiëntcohortgegevens van -omics-onderzoeken en bioinformatica. Daarom kunnen de eerste 5 jaren worden gezien als een investering in de toekomst.

De **tienjarendoelstelling** zou de implementatiefase van het model zijn. Dit zal een grote impact hebben op het gebruik van proefdieren. Modellen (immuuncompetente multi-organmodellen) zouden verder ontwikkeld en geavanceerder moeten worden. Dit zou systemische, chronische, biodistributie- en veiligheidsstudies in staat moeten stellen om het proefdiergebruik in Nederland sterk terug te dringen.

Slotaanbevelingen voor transitie

Een belangrijke belemmering voor veel academische onderzoekers is dat veel gerenommeerde wetenschappelijke tijdschriften en beoordelaars onderzoekers verplichten om data van proefdieronderzoek te includeren om zo hun NAM-data te ondersteunen. Dit is momenteel een veelbesproken onderwerp tijdens

bijeenkomsten van internationale belanghebbenden, wat aangeeft hoe belangrijk dit is voor het vakgebied. De onderzoekinstellingen kunnen hun onderzoekers ondersteunen bij het weerleggen van argumenten door bijv. standaardbrieven aan te leveren. Een andere optie is om via teksten op de websites van de instelling te benadrukken waarom zij hebben gekozen voor NAM's. Toch is het de taak van elke onderzoeker om overtuigende wetenschappelijke argumenten aan te dragen voor de keuze voor NAM's. Verder kan deze horde worden genomen door wetenschappers aan te blijven moedigen om 'open access' te publiceren (dit kan gedaan worden door de publicatiekosten voor veel tijdschriften te betalen). Ook bestaat de mogelijkheid om publicatie in tijdschriften die proefdieronderzoek vereisen te weigeren. Het wetenschappelijke veld moet doorgaan met het waarderen van wetenschappers aan de hand van andere methoden (bijv. wetenschappelijke en maatschappelijke impact) in plaats van de h-index en 'journal impact factor' bij subsidieaanvragen. Deze transitie is al ingezet door NWO en andere wetenschapsfinanciers en dit zal een positieve invloed hebben op het gebruik van NAM's.

Financiering zal altijd een belangrijke aanjager zijn van de transitie naar NAM's. Dit gaat samen met een kritischere beoordeling van de onderzoeksvraag. Hierin wordt vastgesteld of de voorgestelde dierstudie de beste manier is om de onderzoeksvraag te beantwoorden. Financiering van nationale instellingen (bijv. NWO, ZonMW, NWA) en gezondheidsorganisaties (Samenwerkende Gezondheidsfondsen) is onmisbaar om de transitiedoelen te bereiken die worden beschreven in dit streefbeeld. De training en het onderwijs aan wetenschappers aan het begin van hun loopbaan is de sleutel tot transitie. Daarom zou het goed zijn als er meer persoonlijke fellowships en subsidies worden ontwikkeld door financieringsinstanties en dat er financiering komt voor grote consortia om carrièremogelijkheden te bieden.

Tot slot leven we in een wereld die steeds kritischer wordt ten aanzien van onderzoek naar ziekten bij mensen en de behandeling hiervan. Er ontstaan nieuwe aandachtsgebieden voor het verbeteren van gezondheidsonderzoek, zoals de invloed van geslacht, individualiteit en leeftijd op menselijke ziekten en gezondheid. Deze zaken worden steeds belangrijker en vragen om nieuwe benaderingen die lastiger te onderzoeken zijn in diermodellen en waarvoor innovatieve NAM's nodig zijn. Dit is het tijdperk waarin een impuls gegeven zal worden aan onderzoek naar mensen in relevante humane modellen, *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* of *in silico*.

Contactgegevens

Nationaal Comité advies dierproevenbeleid

Postbus 93118 | 2595 AL Den Haag

E-mail: ncad@rvo.nl | website: ncadierproevenbeleid.nl

November 2023 | Publicatie-nr. 23408195