



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

**SLiM: bijdrage aan vermindering van
dierproeven in de domeinen
geneesmiddelen en chemische stoffen**

Leidraad voor andere domeinen en
Intermediaire rol RIVM

RIVM Briefrapport 050512001/2014
R. Vandebriel et al.



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

**SLiM: bijdrage aan vermindering van
dierproeven in de domeinen
geneesmiddelen en chemische stoffen**

Leidraad voor andere domeinen en Intermediaire rol RIVM

RIVM Briefrapport 050512001/2014
R. Vandebriel et al.

Colofon

© RIVM 2014

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

Rob Vandebriel,
Mirjam Luijten,
Jan van Benthem,
Aldert Piersma

Contact:
Rob Vandebriel
GZB
rob.vandebriel@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Ministerie van Economische Zaken, in het kader van V/050512 Beleidsadvisering Alternatieven voor Dierproeven

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven

www.rivm.nl

Publiekssamenvatting

Het RIVM heeft deelgenomen aan een project (SLiM) dat eraan wil bijdragen om minder dierproeven te gebruiken bij testmethoden voor geneesmiddelen en chemische stoffen. Uit het project vloeiden vier studies voort. Twee daarvan worden in dit rapport beschreven; de analyses zijn nog gaande en definitieve resultaten worden medio 2014 bekend.

De eerste studie betrof een testonderdeel voor de toelating van geneesmiddelen op de markt waarbij wordt getoetst of het middel veilig is voor een zich ontwikkelend embryo. Onderzocht is of het nodig is om geneesmiddelen in twee diersoorten (rat en konijn) te testen of dat er één volstaat, en zo ja onder welke voorwaarden. Dankzij de bereidheid van de farmaceutische industrie is een grote database opgezet met bestaande gegevens over de reacties (gevoeligheid) van de twee diersoorten op een reeks aan stoffen.

De tweede studie betrof een testonderdeel voor de toelating van chemische stoffen, en wel de mate waarin stoffen kankerverwekkende eigenschappen hebben. De duur van deze tests verschilt sterk: bij de ene test worden ratten of muizen gedurende twee jaar aan een stof blootgesteld, bij de andere drie tot zes maanden. Op basis van bestaande data wordt geanalyseerd of de twee jaarstudie meerwaarde heeft.

Beide studies sluiten aan bij de doelstelling van het RIVM om het gebruik van dierproeven te verminderen. Dit project onderstreept het belang dat alle partijen die te maken hebben met de keten van alternatieve testmethoden (ontwikkelaars, regelgevers, gebruikers; universiteit, overheid en bedrijfsleven) betrokken zijn bij de ontwikkeling van nieuwe methoden. Het RIVM participeerde als overheidspartner om kennis in te brengen over validatie en acceptatie van testprotocollen.

Trefwoorden: SLiM, veiligheid, embryo, kanker, proefdieren, toelating, geneesmiddelen, chemische stoffen

Abstract

The RIVM has participated in a project (SLiM) that intends to contribute to less animal experiments in testing methods for pharmaceuticals and chemicals. Four studies arose from the project. Two of them are described in this report, the analyses are ongoing and the results will be known mid-2014.

The first study involved a test that is required for market authorization of pharmaceuticals. It evaluates whether a drug is safe for the developing embryo. It was investigated whether there is added value in testing a drug in two species (rat and rabbit) and if so, under what conditions. Thanks to the willingness of the pharmaceutical industry, a large database with existing data was set up comprising information on the reactions (sensitivity) of the two species for a range of pharmaceuticals.

The second study involved a test that is required for market authorization of chemicals, namely the extent to which substances have carcinogenic properties. The duration of these tests varies widely: in one test rats or mice are exposed to a substance for two years, while in another exposure is for three to six months. Based on existing data it is analysed whether the two-year study has added value.

Both studies are consistent with the RIVM objective of reducing animal testing. This project underlines the importance that all parties involved in the chain of alternative test methods (developers, regulators, end-users; universities, government and industry) are involved in the development of new methods. The RIVM participated as a government partner to bring about knowledge on validation and acceptance of testing protocols.

Keywords: SLiM, safety, embryo, cancer, laboratory animals, authorisation, pharmaceuticals, chemicals

Inhoudsopgave

Publiekssamenvatting – 3

Abstract – 5

Inhoudsopgave – 7

Samenvatting – 9

1 SLiM – 11

2 De keten in het geneesmiddelen domein – 13

3 Is het nodig om ontwikkelingstoxiciteit van geneesmiddelen altijd in twee species vast te stellen? – 17

3.1 Embryonale stamceltest – 17

4 Dierstudies voor het vaststellen van carcinogeniteit – 19

4.1 Inleiding – 19

4.2 Informatiebronnen – 20

4.3 Evaluatie van beschikbare gegevens – 21

4.4 Classificatie & labeling en chemische veiligheidsbeoordeling – 22

4.5 Geïntegreerde teststrategie (ITS) – 23

5 Is een kortere test met minder dieren geschikt voor het vaststellen van kankerverwekkende eigenschappen van chemische stoffen? – 27

6 Leidraad ten behoeve van andere domeinen – 29

6.1 Conclusies – 29

7 Intermediaire rol van het RIVM – 31

7.1 Missie en taken op het gebied van 3V – 31

7.2 Ambities – 32

7.3 Zwaartepunten – 32

7.4 Conclusies – 33

8 Referenties – 35

Samenvatting

Het RIVM heeft deelgenomen aan een (proef)project onder de naam SLiM ('Slimmer van innovatie naar mens'; ondertitel 'toepassing van 3V's in de ontwikkeling van geneesmiddelen en functionele voeding'). Het doel van SLiM was een modelproject te vormen voor de keten tussen een kansrijke testmethode en de implementatie/toepassing ervan in de praktijk. Het ging daarbij om het verkrijgen van kennis en inzicht rondom de ontwikkeling, validatie en implementatie van alternatieven voor dierproeven. Omdat het een ketenproject is deden alle partners uit de keten mee.

In het eerste jaar van SLiM zijn vier onderzoeksprojecten geselecteerd op grond van praktische haalbaarheid, communicatiemogelijkheden, impact op dierenwelzijn, toepasbaarheid en acceptatie door regelgevende instanties op nationaal en internationaal niveau. Twee van deze onderzoeksprojecten worden in dit briefrapport behandeld, namelijk (1) de noodzaak van het testen van een tweede species voor ontwikkelingstoxiciteit en (2) het gebruik van resultaten uit kortdurende toxiciteitsstudies om de carcinogeniteit van stoffen te voorspellen. Het eerste onderzoeksproject betreft het domein geneesmiddelen; het tweede het domein chemische stoffen.

De twee onderzoeksprojecten hebben als uitgangspunt "regulatory learning". Dit uitgangspunt gebruikt retrospectieve analyse van resultaten uit proefdierstudies die zijn uitgevoerd volgens bestaande procedures, met als doel optimalisatie en innovatie van testmethoden.

De twee onderzoeksprojecten sluiten goed aan bij de RIVM strategie:

1. Beide projecten vallen binnen het geneesmiddelen- en het chemische stoffendomein; deze domeinen kunnen elkaar versterken (synergie). Binnen het SLiM project betreffen de projecten ontwikkelingstoxiciteit en carcinogeniteit de domeinen geneesmiddelen resp. chemische stoffen; buiten het SLiM project chemische stoffen resp. geneesmiddelen (dus andersom).
2. Beide projecten hebben een sterke basis in wetenschap en regelgevende kaders; dit geldt voor het domein geneesmiddelen en het domein chemische stoffen.
3. Beide projecten vallen onder het RIVM zwaartepunt "Regulatory learning".
4. Het project ontwikkelingstoxicologie valt binnen de RIVM zwaartepunten "Reproductietoxiciteit" en "Integrated Testing Strategies" (ITS). Ten aanzien van het laatste: er zal worden nagegaan of de muis embryonale stamcel test (mEST) ingezet kan worden om tot een ITS te komen, die op termijn tot een verdere vermindering van het testen van de tweede species moet leiden.

Aangezien beide projecten binnen het geneesmiddelen domein en het chemische stoffen domein vallen en een basis hebben in wetenschap en regelgevende kaders, is de mogelijkheid voor de domeinen om van elkaar te leren maximaal.

1 SLiM

Geneesmiddelen en functionele voeding dienen niet alleen bewezen werkzaam te zijn in de mens, maar moeten ook voldoen aan strikte veiligheidseisen. Dit laatste geldt ook voor chemische stoffen. In dit veiligheidsonderzoek vormen dierproeven nog altijd een belangrijk onderdeel. Het 3V concept is opgesteld om tot vermindering van dierproeven te komen. Voor realisatie van dit concept is samenwerking tussen kennisinstellingen, industrie en overheidsinstanties essentieel. Alleen op deze wijze kunnen nieuw ontwikkelde alternatieven voor dierproeven zonder vertraging worden geaccepteerd en geïmplementeerd in regelgeving.

Het RIVM heeft deelgenomen in een (proef)project onder de naam SLiM ('Slimmer van innovatie naar mens'; ondertitel 'toepassing van 3V's in de ontwikkeling van geneesmiddelen en functionele voeding'). Het doel van SLiM was om een modelproject te vormen voor de keten tussen een kansrijke testmethode en de implementatie/toepassing ervan in de praktijk. Het ging daarbij om het verkrijgen van kennis en inzicht rondom de ontwikkeling, validatie en implementatie van alternatieven voor dierproeven. Omdat het een ketenproject is deden alle partners uit de keten mee.

Regelgevers zijn vanaf het begin bij dit project betrokken. Hierdoor werd geborgd dat de testen en testresultaten die het onderwerp zijn van de gekozen onderzoeksprojecten, passen binnen vragen die door regelgevende instanties worden gesteld. Dit is een voorwaarde voor regelgevende instanties om de binnen SLiM ontwikkelde alternatieve methoden te accepteren als alternatief voor de huidige verplichte dierproeven in het veiligheidsonderzoek.

In 2011, het eerste jaar van SLiM, zijn vier onderzoeksprojecten geselecteerd op grond van praktische haalbaarheid, communicatiemogelijkheden, impact op dierenwelzijn, toepasbaarheid en acceptatie door regelgevende instanties op nationaal en internationaal niveau. De geselecteerde projecten betreffen (1) noodzaak van het testen van een tweede species voor ontwikkelingstoxiciteit, (2) *in vitro* bepaling van allergeniciteit van hydrolysaten, (3) gebruik van kortdurende toxiciteitsstudies voor de voorspelling van carcinogeniciteit en (4) biobeschikbaarheid en barrièrefunctie van de darm. De onderzoeken zijn per 1 januari 2012 gestart en lopen tot begin 2014.

In dit briefrapport wordt over de projecten (1) en (3) gerapporteerd, omdat zij de domeinen geneesmiddelen en chemische stoffen betreffen, de projecten (2) en (4) betreffen voeding.

De volgende onderwerpen worden besproken:

1. Bevindingen, zowel inhoudelijk als procesmatig. Op basis van de in SLiM verworven inzichten wordt een leidraad ten behoeve van andere domeinen opgesteld.
2. Het versterkt inzetten van de intermediaire rol van het RIVM in de keten m.b.t. implementatie, in SLiM en in toekomstige activiteiten in de keten, zowel inhoudelijk als procesmatig.

SLiM heeft bijgedragen aan een toegenomen inzicht in de keten, met belemmeringen en mogelijkheden voor het versnellen van de implementatie van de 3 V's in de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen, chemische stoffen en functionele voeding.

2 De keten in het geneesmiddelen domein

In de keten van validatie, acceptatie en implementatie van 3V-testen zijn in de Programmeringsstudie en het RIVM-rapport 'Knelpunten bij de ontwikkeling, validatie en implementatie van Alternatieven voor Dierproeven' de context van diverse toepassingsdomeinen en de knelpunten daarin beschreven. Tot de knelpunten behoort in ieder geval steeds het functioneren van de keten als totaal. In de keten als totaal (dus niet/minder de individuele schakels) moet verbetering worden gebracht. De algemene opvatting is dat het traject validatie-acceptatie-implementatie stroef verloopt.

In de domeinen geneesmiddelen en chemische stoffen bestaat veel aandacht voor alternatieven voor dierproeven. Dominante trends zijn (1) de bewustwording dat proefdieren onvoldoende voorspellend zijn voor de mens, mede gezien het toenemende inzicht dat verschillen in leeftijd en genetische opmaak een belangrijke rol spelen in werkzaamheid en veiligheid van geneesmiddelen, c.q. de veiligheid van chemische stoffen, (2) proefdiervrije methoden die werkzaamheid en veiligheid van geneesmiddelen en veiligheid van chemische stoffen bij de mens goed kunnen voorspellen en (3) de aandacht voor 'high-throughput' methoden voor het screenen van 'lead compounds' in de farmaceutische industrie.

De toelating van geneesmiddelen in Europa is sterk gereguleerd. Er zijn toelatingssystemen op alle fasen die een geneesmiddel doorloopt:

1. Nationale autoriteiten voor het toelaten van klinisch onderzoek. In Nederland zijn dit de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO) en de Medisch-ethische toetsingscommissies (METCs).
2. Nationale en Europese autoriteiten voor de markttoelating. In Nederland is dit het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG) en in Europa de 'European Medicines Agency' (EMA).
3. Nationale autoriteiten voor controle en "batch release" na markttoelating, gecoördineerd door de 'European Directorate for the Quality of Medicines' (EDQM). In Nederland wordt dit uitgevoerd door het Centrum voor Gezondheidsbescherming (GZB) van het RIVM. Dit betreft vooral vaccins en andere bio(techno)logische producten.

Resultaten verkregen met proefdieren tijdens de ontwikkeling en bij de controle van het uiteindelijke geneesmiddel, spelen een belangrijke rol in dit proces. Werkingsmechanisme en doseringssterkte kunnen vaak alleen met proefdieren bestudeerd worden. Door diverse initiatieven gedurende de afgelopen decennia, onder andere gesteund door de "European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing" (EURL ECVAM), EDQM, de "European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing" (EPAA) en de "Organisation for Economic Co-operation and Development" (OECD), zijn toch veel proefdierstudies ten behoeve van geneesmiddelencontrole komen te vervallen, dan wel vervangen door minder belastende testen.

Toelating van geneesmiddelen wordt op diverse bestuursniveaus gereguleerd. Naast nationale organisaties zoals in Nederland het CBG, bestaan ook internationale organisaties zoals de EMA, met de 'Committee for Medicinal Products for Human Use' (CHMP) als belangrijkste commissie, en de WHO, met onder andere de 'Expert Committee on Biological Standardization' (ECBS). De EMA/EU neemt ook deel in de 'International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use' (ICH), maar de ICH

heeft zelf geen implementatiebevoegdheid. Implementatie hoort bij de regionale autoriteiten.

Te hanteren eisen en richtlijnen zijn onder andere nationale wetgeving, Europese directieven (richtlijnen met wettelijke status) zoals het EU-directief 2001/83, de EMA-CHMP richtlijnen, Europese Farmacopee monografie eisen en richtlijnen die wereldwijd worden toegepast (zoals WHO-eisen, ICH-richtlijnen). Hoewel gestreefd wordt naar harmonisatie tussen eisen en richtlijnen in ICH-verband (tussen bijvoorbeeld de FDA, Japan en Europa), kunnen de eisen gesteld aan een geneesmiddel per land variëren. De uit te voeren (dier)testen kunnen hierdoor per land variëren. In dit opzicht gaat de WHO heel nadrukkelijk uit van de zelfstandige beslissingsbevoegdheid van de nationale autoriteiten.

Een belangrijk aspect voor de keuze van uit te voeren testen voor een geneesmiddel is de markt waar het product voor bedoeld is. Door een uitgebreide consolidatieslag in de farmaceutische sector worden geneesmiddelen vaak geproduceerd door mondiaal opererende farmaceutische bedrijven voor wereldwijd gebruik. Dit betekent dat een fabrikant vaak alle cumulatief gevraagde studies en testen uitvoert, zodat hij het product op al zijn markten kan afzetten. Om deze reden dient voor het laten vervallen van een test vaak wereldwijde consensus te bestaan. Dit was een belangrijke reden voor het starten van het ICH-proces.

Tijdens de ontwikkeling van een geneesmiddel dient de werkzaamheid en veiligheid aangetoond te worden. De eisen zijn in algemene zin opgesteld door EU-directief 2001/83. De EMA-CHMP heeft op basis hiervan nadere (gedetailleerde) eisen vastgelegd in richtlijnen. De fabrikant kan hiervan afwijken mits dit op wetenschappelijke wijze, voldoende wordt beargumenteerd. De benodigde veiligheidsinformatie, deels bepaald in proefdieren, dient te worden verstrekt aan de geneesmiddelenautoriteit door middel van een vastgestelde structuur, het 'Common Technical Dossier' (CTD) van de ICH.

De richtlijnen beschrijven min of meer de onderdelen van het CTD, en daarmee ligt de structuur van de ontwikkeling van een geneesmiddel in feite vast. Zo zijn er richtlijnen voor genotoxiciteit, 'repeated-dose' toxiciteit, reproductietoxiciteit en carcinogeniteit. Er zijn ook richtlijnen voor specifieke categorieën, zoals voor recombinant eiwitten ('biotechnology-derived proteins') en vaccins. Daarin wordt aangegeven dat bepaalde standaardbenaderingen voor deze categorieën niet altijd nodig zijn, of dat onderzoek met slechts één diersoort voldoende is.

Het is voor bepaalde producten soms lastig om het noodzakelijke pakket aan eisen vast te stellen, maar uiteindelijk laten de autoriteiten een grote flexibiliteit toe in de benadering betreffende veiligheid. Er zijn ook veel mogelijkheden om hierover tijdens het ontwikkelingsproces advies te krijgen van individuele registratieautoriteiten, dan wel van de EMA.

Het vervangen van een testprocedure in dieren, zoals verwoord in bovengenoemde richtlijnen, door een *in vitro* benadering is niet zo gemakkelijk.

Er is in Europees verband een 'Reflection Paper' geschreven over de vervanging van standaard *in vivo* testen door *in vitro* procedures. In de praktijk wordt echter nauwelijks een beroep gedaan op dit document. Dit was reden voor de 'Safety Working Party' van de EMA-CHMP om het initiatief te nemen een nieuw document op te stellen dat een beter kader schept hoe in de praktijk om te gaan met de 3V's.

Voor een verandering in de zogenaamde 'Testing Strategy' lijkt vooral initiatief van de ICH nodig. In 2006 is een prioriteringslijst afgesproken, waarin genotoxiciteit de hoogste prioriteit kreeg omdat er veel nieuwe kennis was op dit

terrein. Het feit dat bij *in vitro* testen veel vals-positieven werden waargenomen, was aanleiding om de strategie als geheel te herzien. Daarnaast werd aan de hand van de richtlijnen voor studies die noodzakelijk zijn voor het starten van klinisch onderzoek in de verschillende fasen van een geneesmiddel (ICH-M3), het hele pakket aan studies nog eens doorgenomen. Daarmee werd voor elke fase nagegaan welke studies echt noodzakelijk zijn.

Een voorbeeld hiervan is dat voor het starten van een Fase II studie met inclusie van vrouwen in de vruchtbare leeftijd, volstaan kan worden met het verschaffen van de 'non-GLP dose-range finding' gegevens voor reproductietoxiciteit. Voor dit beperkte doel geven deze gegevens al voldoende zekerheid. Een volledige studie is pas nodig in het stadium van marktautorisatie, als een groter publiek wordt blootgesteld zonder directe controle.

Een ander voorbeeld van het nagaan welke studies echt noodzakelijk zijn, is de overweging of de gebruikelijke twee species voor embryofoetale toxiciteitstesten wel nodig zijn, dan wel dat één species vervangen zou kunnen worden door een *in vitro* benadering. Dit is door de ICH aan de orde gesteld in 2009. Naar aanleiding van het afronden van het EU REPROTECT project, is in juni 2010 de stand van zaken met betrekking tot *in vitro* testen ('whole embryo culture', 'embryonic stem cell test') geëvalueerd. Er kon niet tot besluitvorming gekomen worden, ook omdat het validatieprogramma niet gericht was op de mogelijkheid om op deze wijze (gedeeltelijke vervanging) geïmplementeerd te worden.

Genoemde voorbeelden geven aan dat voor implementatie van nieuwe teststrategieën contact met de werkgroepen met deskundigen binnen de registratieautoriteiten, van groot belang is. Dit geldt al in de fase van testontwikkeling en validatie, omdat dan al draagvlak kan worden ontwikkeld voor acceptatie. Wanneer vervolgens de medewerking wordt verkregen van deze deskundigen op het niveau van de ICH ligt implementatie binnen bereik. Een voorbeeld hiervan is de herziening van studies voor reproductietoxiciteit bij apen. Deze worden nu uitsluitend gebruikt voor monoklonale antistoffen die ook bij vrouwen in de vruchtbare leeftijd (bij indicaties anders dan kanker) zullen worden toegepast. Het is echter gebleken dat over het algemeen een embryofoetale toxiciteitstudie (behandeling van dag 20 tot dag 50, en keizersnede op dag 100 van de dracht [totale dracht 155 dagen]) niet leidt tot echte blootstelling van het embryo omdat de placenta deze geneesmiddelen niet doorlaat. Dat begint pas rond dag 70 (voor de mens het tweede trimester van de zwangerschap). Daarom wordt nu op het niveau van de ICH nagedacht om de gebruikelijke twee studies (de 'embryo-fetal developmental' [EFD] studie en de 'pre- and postnatal developmental' [PPND] studie) te combineren tot één studie, waarbij mogelijk slechts één dosisgroep noodzakelijk is. Dat zou al een behoorlijke vermindering van het aantal apen opleveren.

Voor de controle van geregistreerde geneesmiddelen worden in de regel geen proefdieren gebruikt. Wanneer aangetoond kan worden dat een product consistent geproduceerd kan worden en productieafwijkingen met laboratoriumtesten aangetoond kunnen worden, zullen proefdierstudies niet worden toegepast. Uitzondering hierop zijn enkele 'biologicals'. Ter beperking van *in vivo* testen worden alternatieve testen ontwikkeld. Vaak zijn de ontwikkelde alternatieve testen minder belastend dan de originele test of worden de producten efficiënter getest (bijvoorbeeld een combinatie van testen zonder extra ongerief). Veelbelovende modellen worden in Europa internationaal gevalideerd door steun van vooral EDQM en ECVAM. Nederland heeft de afgelopen decennia deze studies ondersteund via het RIVM en het NVI. Vervolgens kunnen de methoden worden opgenomen in de Europese Farmacopee, op gezag van de Farmacopee-werkgroepen. Ontwikkelde

alternatieve methoden kunnen dan eenvoudiger worden overgenomen door fabrikanten. Deze methoden dienen echter wel voor ieder specifiek product te worden gevalideerd. Vervolgens dient een wijziging van het registratiedossier aangevraagd te worden in alle landen waar het product geregistreerd is. Dit betekent in de praktijk een erg langdurig maar ook erg kostbaar proces voor een fabrikant (vele malen 'registration fees', vele verschillende vragen van de diverse registratieautoriteiten, onzekerheid of alle landen de variatie wel zullen accepteren). Dit knelpunt geldt voor humane geneesmiddelen, maar nog meer voor veterinaire geneesmiddelen door de lage marges op deze producten. Acceptatie van onderlinge beoordelingsconclusies tussen landen ontbreekt regelmatig in dit proces.

Het bovenstaande stuk heeft getracht voor het geneesmiddelen domein de keten gericht op 3V alternatieven weer te geven. De internationale, zelfs wereldwijde dimensie is dominant. Vanuit het domein worden initiatieven genomen om te komen tot 3V alternatieven.

3 Is het nodig om ontwikkelingstoxiciteit van geneesmiddelen altijd in twee species vast te stellen?

In dit project wordt het uitgangspunt "regulatory learning" toegepast. Dit uitgangspunt gebruikt retrospectieve analyse van resultaten van bestaande testen om voorstellen voor optimalisatie en innovatie te formuleren. De analyse van studies naar ontwikkelingstoxiciteit in rat en konijn is gericht op de prioritering van één soort, eventueel gedifferentieerd voor verschillende klassen van geneesmiddelen. Een andere mogelijke uitkomst is het formuleren van criteria om voor uitstel of "waiving" van testen in een tweede species te beslissen. Naast deze exercitie zal de toegevoegde waarde van proefdiervrije alternatieve methoden, in het bijzonder de muis embryonale stamceltest (mEST), in de toxicologische risicokarakterisering onderzocht worden, op basis van gegevens van vooral die verbindingen die verschillen in effect tussen beide soorten laten zien. Beide inspanningen zijn gericht op verbetering van de testefficiëntie en vermindering van het gebruik van proefdieren, terwijl de huidige kwaliteit van de risicobeoordeling wordt gegarandeerd.

De database structuur voor het verzamelen van gegevens uit studies naar ontwikkelingstoxiciteit was een aanpassing van de "Toxicity Reference Database" (ToxRefDB) in samenwerking met de "Environmental Protection Agency" van de VS. Meer specifiek werd de ToxRefDB, die is ontworpen voor chemische stoffen en pesticiden, uitgebreid met informatie over systemische blootstelling van teststoffen. Tegelijkertijd werd de Nederlandse CBG database geraadpleegd voor dossiers over ontwikkelingstoxiciteit van geneesmiddelen die op de markt zijn. Daarnaast raakten door actieve samenwerking met ILSI-HESI-DART¹ farmaceutische bedrijven wereldwijd betrokken bij dit proces, en zij leverden gepubliceerde en ongepubliceerde gegevens aan van geneesmiddelen die al of niet op de markt waren gekomen. De aanvankelijke verwachte grootte van de database van ca. 150 vergelijkingen tussen rat en konijn werd aanzienlijk overschreden, met momenteel ca. 450 vergelijkingen.

Voortgang van het project is gemeld op verschillende internationale wetenschappelijke en regelgevende bijeenkomsten om momentum te krijgen voor het verstrekken van gegevens om de database zo volledig mogelijk te krijgen. Naast lopende samenwerkingen op het Europese (CBG, EMA), VS (HESI-DART) en wereldniveau (ICH), hebben nu ook de Japanse autoriteiten voor geneesmiddelen hun belangstelling getoond, en mogelijke samenwerking wordt momenteel onderzocht. Onlangs (september 2013) werd een workshop van de "European Teratological Society" gehouden.

3.1 Embryonale stamceltest

Bestaande gegevens uit de mEST worden vergeleken met bestaande gegevens uit studies naar ontwikkelingstoxiciteit met rat en konijn. Doel van deze vergelijking is retrospectief na te gaan of de resultaten uit de mEST informatie hadden kunnen geven over de vraag of het testen van één species voldoende was geweest en zo ja, welke. Dit zal vorm krijgen als een geïntegreerde teststrategie (ITS).

Op basis van de gegevens uit deze geneesmiddelen database wordt voor enkele tientallen stoffen (waar rat en konijn een duidelijk verschil te zien geven) de mEST uitgevoerd. Dit onderzoek loopt tot maart 2014.

4 Dierstudies voor het vaststellen van carcinogeniteit

4.1 Inleiding

Chemische stoffen worden gedefinieerd als carcinogeen (kankerverwekkend) als ze tumoren veroorzaken, het aantal tumoren en/of de maligniteit verhogen, of de tijdsduur totdat een tumor ontstaat verkorten. Benigne (goedaardige) tumoren waarvan aangenomen wordt dat ze de potentie hebben zich te ontwikkelen tot kwaadaardige (maligne) tumoren, worden algemeen beschouwd als maligne tumoren. Chemische stoffen kunnen kanker veroorzaken via elke blootstellingsroute (zoals inademing, inslikken, toegepast op de huid, of geïnjecteerd), maar de carcinogeniteit (ja/nee) en de carcinogene potentie (sterkte) kan afhangen van de omstandigheden van blootstelling (zoals route, niveau, patroon en duur van de blootstelling). Carcinogene stoffen kunnen worden geïdentificeerd uit epidemiologische studies, dierproeven, (kwantitatieve) structuur-activiteit relaties ((Q)SAR)-analyses, en extrapolatie van structureel vergelijkbare stoffen ("read-across"). De bepaling van de carcinogeniteit van een stof is gebaseerd op een "Weight of Evidence" benadering. Criteria voor classificatie worden gegeven in de EU-richtlijn 67/548/EEC.

Het proces van carcinogenese betreft de overgang van normale cellen naar kankercellen via een reeks stappen die zowel genetische veranderingen (zoals mutaties) als niet-genetische gebeurtenissen omvatten. Niet-genetische gebeurtenissen worden gedefinieerd als wijzigingen/processen die worden gemedieerd door mechanismen die geen invloed hebben op de primaire DNA-volgorde en toch de incidentie van tumoren verhoogt of de latentietijd van het verschijnen van tumoren verlaagt.

Carcinogene stoffen worden traditioneel verdeeld in twee categorieën op basis van het werkingsmechanisme: genotoxisch en niet-genotoxisch. Genotoxische werkingsmechanismen betreffen genetische veranderingen veroorzaakt door directe wisselwerking van de stof met DNA die resulteert in een verandering in de primaire DNA-volgorde. Een stof kan ook op indirecte wijze leiden tot genetische veranderingen, na interactie met andere cellulaire processen. Niet-genotoxische werkingsmechanismen omvatten epigenetische veranderingen, d.w.z. effecten die geen veranderingen in het DNA met zich meebrengen, maar die genexpressie beïnvloeden, cel-cel communicatie veranderen, of andere factoren die betrokken zijn bij het proces van carcinogenese. Net als bij andere niet-genotoxische werkingsmechanismen wordt aangenomen dat deze een drempel hebben (zie verder).

Het doel van onderzoek naar de carcinogene eigenschappen van stoffen is om potentiële carcinogenen in de mens, hun werkingsmechanisme(n) en hun potentie te identificeren.

Met betrekking tot carcinogeniteit en carcinogene potentie is de meest geschikte informatiebron epidemiologische studies bij de mens. Bij het ontbreken van gegevens over de mens kunnen carcinogeniteitstesten in proefdieren worden gebruikt om carcinogene en niet-carcinogene stoffen te onderscheiden. De resultaten van deze studies moeten vervolgens worden geëxtrapoléerd naar de mens, zowel kwalitatief als kwantitatief. Dit introduceert onzekerheid voor wat betreft de potentie en de relevantie voor de mens, vanwege species-specifieke factoren zoals verschillen in metabolisme en toxicokinetiek en het extrapoleren van hoge doses gebruikt in dierproeven naar

doseringen waaraan mensen gewoonlijk worden blootgesteld. Deze onzekerheid geldt overigens voor alle vormen van toxiciteit.

Zodra een chemische stof als carcinogeen is geïdentificeerd, bestaat de behoefte om het onderliggende werkingsmechanisme op te helderen, d.w.z. na te gaan of de stof al of niet direct genotoxisch is.

Voor genotoxische carcinogenen is het over het algemeen niet mogelijk om de drempelwaarde af te leiden uit de "no-observed-effect-level" in een dosis-response curve, ook al zou een biologische drempel kunnen bestaan waaronder kanker niet wordt geïnduceerd.

Men neemt aan dat voor niet-genotoxische carcinogenen, drempels bestaan waarbij geen effect optreedt. Deze drempels kunnen ook bestaan voor bepaalde carcinogene stoffen die genetische veranderingen veroorzaken via indirecte effecten op DNA, na interactie met andere cellulaire processen. In het laatste geval is het wetenschappelijk bewijs dat nodig is om deze indirecte manier van genotoxische werking op een overtuigende manier te onderbouwen moeilijker te verkrijgen dan voor niet-genotoxische carcinogenen die geen effect op DNA veroorzaken. Studies in de mens voor het maken van een onderscheid tussen de hierboven genoemde vormen van activiteit, zijn over het algemeen niet beschikbaar en een conclusie is feitelijk afhankelijk van de uitkomst van mutageniteits- en genotoxiciteitstesten en andere mechanistische studies. Daarnaast kunnen dierproeven ook informatie geven over het onderliggende mechanisme van carcinogeniteit.

4.2 Informatiebronnen

Er zijn veel verschillende informatiebronnen met betrekking tot carcinogeniteit voor de mens. Deze bronnen leiden niet alleen tot identificatie van mogelijke carcinogene activiteit, maar als een stof wordt ingedeeld als waarschijnlijk carcinogeen moeten deze bronnen ook informatie geven over het onderliggende werkingsmechanisme en de waarschijnlijke carcinogene potentie. REACH vereist een juiste classificatie en labeling, evenals een kwantitatieve risicobeoordeling die conclusies mogelijk maakt over de voorwaarden voor veilig gebruik van de chemische stof. Dat wil zeggen dat de gegevens dienen te leiden tot een conclusie over een werkingsmechanisme met of zonder drempelwaarde en tot een descriptor van de dosis (karakterisering van de dosis-respons), bij voorkeur in kwantitatieve termen.

Verschillende bronnen informeren anders over de aspecten van "hazard" identificatie, werkingsmechanisme, of carcinogene potentie.

Er kunnen veel soorten studies beschikbaar zijn die directe of indirecte informatie opleveren om carcinogeniteit voor de mens te vast te stellen, zoals:

- carcinogeniteitsstudies (conventionele lange-termijn of "life-time" dierproeven): carcinogeniteitsproeven worden meestal uitgevoerd met ratten of muizen. Blootstelling aan teststoffen kan via orale, inhalatie of dermale routes. De selectie van de blootstellingsroute wordt vaak bepaald door *a priori* aannames met betrekking tot de routes van blootstelling van de mens en/of andere gegevensbronnen (bijv. epidemiologische studies of "repeated-dose" toxiciteitsstudies in proefdieren) die aanwijzingen kunnen geven voor de relevantie van een bepaalde blootstellingsroute. Gestandaardiseerde richtlijnen voor dergelijke studies zijn ontwikkeld en goed gevalideerd (bijv. OECD TG 451, 453 of US-EPA 870.4200).
- genotoxiciteitsstudies *in vivo*: het vermogen van stoffen om mutaties of genotoxiciteit te veroorzaken kan wijzen op mogelijke carcinogeniteit. Er bestaat over het algemeen een goede correlatie tussen positieve

bevindingen betreffende *in vivo* genotoxiciteit en carcinogeniteit bioassay resultaten.

- **“repeated-dose” toxiciteitstesten:** deze kunnen weefsels identificeren die specifieke “targets” zijn voor toxiciteit en de daaropvolgende carcinogene effecten. Waarschijnlijk bevorderen pre-neoplastische veranderingen (zoals hyperplasie en metaplasie) tumorontwikkeling en kunnen ze helpen bij het ontwikkelen van dosis-effect relaties.

4.3 Evaluatie van beschikbare gegevens

Het doel van deze evaluatie is om gegevens over de carcinogeniteit van de stof te verkrijgen. Is de stof kankerverwekkend en zo ja, wat is het onderliggende werkingsmechanisme (met of zonder drempel) en wat is de carcinogene potentie (d.w.z. is er behoefte om een dosis descriptor te definiëren)?

Een evaluatie van bovengenoemde eigenschappen vereist een combinatie van verschillende soorten informatie. Een dergelijke evaluatie heeft een “Weight of Evidence” benadering nodig om tot conclusies te komen.

In vivo data kan direct informatie geven over de carcinogene eigenschappen van een stof, eventuele onderliggende werkingsmechanismen en de potentie.

Testen voor carcinogeniteit worden normaal gesproken uitgevoerd in ratten of muizen volgens standaard testrichtlijnen (bijv. OECD TG 451, 453 of US-EPA 870.4200) en de conclusie is gebaseerd op vergelijking van de incidentie, de aard en het tijdstip van optreden van neoplasie in behandelde en controledieren.

“Repeated-dose” toxiciteit kan nuttige aanvullende informatie verstrekken aan de “Weight of Evidence” die verzameld is om te bepalen of een stof carcinogeen is en voor potentiële onderliggende werkingsmechanismen. Bijvoorbeeld kan de inductie van hyperplasie en/of pre-neoplastische lesies bijdragen aan de “Weight of Evidence” voor carcinogeniteit. Toxiciteitsstudies kunnen ook bewijs leveren voor immunosuppressieve activiteit, een voorwaarde die tumorontwikkeling bevordert onder omstandigheden van chronische blootstelling.

Een conceptueel kader is ontwikkeld dat een gestructureerde en transparante aanpak van de “Weight of Evidence” beoordeling van het werkingsmechanisme van carcinogene stoffen geeft. Dit kader moet worden gevolgd als het werkingsmechanisme essentieel is voor de risicobeoordeling die voor een carcinogene stof wordt ontwikkeld en kan belangrijk zijn voor het vaststellen of een stof kanker induceert via genotoxische of niet-genotoxische mechanismen.

Afdoende gegevens over de mens voor de evaluatie van carcinogene eigenschappen van een stof zijn meestal niet beschikbaar en dan moeten alternatieve benaderingen worden gebruikt.

Testsystemen voor het identificeren van genotoxische carcinogenen zijn redelijk goed ontwikkeld en geven adequate dekking van deze eigenschap. Er bestaat overeenstemming dat carcinogenen in dieren die een genotoxisch werkingsmechanisme hebben redelijkerwijs kunnen worden beschouwd als carcinogeen in de mens, tenzij er overtuigend bewijs is dat de mechanismen die mutageniteit en carcinogeniteit induceren in dieren niet relevant zijn voor de mens. Het is echter onduidelijk, en dit introduceert enige onzekerheid, wat de relatie is tussen de carcinogene potentie bij dieren en bij mensen.

Naast de carcinogeniteit bioassay (de “life-time” dierproef) zijn er geen gevoelige en selectieve testsystemen om niet-genotoxische carcinogenen te identificeren. Bij het ontbreken van informatie vooraf over de carcinogeniteit van structureel verwante chemische stoffen kunnen aanwijzingen voor mogelijke carcinogene eigenschappen komen uit bestaande “repeated-dose” toxiciteit

gegevens, of *in vitro* cel transformatie assays. Echter, de eerste test heeft een lage gevoeligheid (bijv. in het geval van een 28-dagen studie), terwijl de tweede test mogelijk kan leiden tot een over-voorspelling van carcinogeniteit. Er zijn onvoldoende gegevens beschikbaar voor verdere algemene "guidance" in dit opzicht.

Niet-genotoxische carcinogenen zijn moeilijk te identificeren bij afwezigheid van testgegevens over carcinogeniteit uit dierstudies. Toch kan worden gesteld dat de huidige risicobeoordelingsmethode het risico voor carcinogene effecten via dit werkingsmechanisme ook moet dekken. De huidige risicobeoordeling voor veel niet-genotoxische carcinogenen is gebaseerd op de "No Observed Adverse Effect Levels" (NOAEL) voor "precursor" effecten of toxiciteit in het "target" orgaan. Om onzekerheid aan te pakken worden "assessment factors" (onzekerheidsfactoren) toegepast. Deze risicobeoordeling wordt echter niet uitgevoerd, indien de stof niet als gevaarlijk is geclassificeerd voor andere eigenschappen.

Eenmaal geïdentificeerd als een niet-genotoxisch carcinogeen kan er onzekerheid bestaan over de relevantie hiervan voor de mens, dat wil zeggen de relevantie voor de mens van het onderliggende werkingsmechanisme. Bij het ontbreken van specifieke gegevens hierover, worden observaties in het dier gezien als relevant voor de mens. Toch zal extra onzekerheid bestaan voor de relatie tussen carcinogene werking bij dieren en bij mensen.

Tenslotte is gebleken dat conventionele testen voor carcinogeniteit in dieren ongevoelig zijn voor een aantal stoffen die carcinogeen zijn in de mens, zoals asbest en arseenverbindingen. Er kan worden aangetoond dat deze stoffen carcinogeen zijn als de testomstandigheden worden gewijzigd, wat illustreert dat er altijd een mogelijkheid bestaat dat een chemische stof een carcinogeen gevaar kan opleveren bij de mens, maar wordt gemist in conventionele dierstudies. Dit geldt ook voor andere toxicologische eindpunten en dient door "risk managers" in aanmerking te worden genomen, vooral bij het maken van beslissingen over de aanvaardbaarheid van scenario's waaruit bijzonder hoge blootstellingen aan werknemers en/of consumenten blijkt.

4.4 Classificatie & labeling en chemische veiligheidsbeoordeling

Om te besluiten over "classificatie en labeling" met betrekking tot carcinogeniteit, moeten de beschikbare gegevens worden gewogen met behulp van EU-richtlijn 67/548/EEG.

Naast de identificatie van een chemische stof als carcinogeen uit gegevens van dierstudies, epidemiologische gegevens of beide, vormt het vaststellen van een dosis-respons een essentiële verdere stap om carcinogene risico's voor bepaalde blootstellingsvoorwaarden of -scenario's te karakteriseren. Een cruciaal element in deze beoordeling is de identificatie van het werkingsmechanisme dat de basis vormt van de waargenomen tumorvorming, dat wil zeggen of de inductie van tumoren al of niet via een genotoxisch mechanisme verloopt.

In regelgeving wordt algemeen aangenomen dat bij gebrek aan gegevens over het tegendeel, een effect-drempel niet kan worden geïdentificeerd voor genotoxische carcinogenen. Het is dan dus niet mogelijk om een "no-effect level" te definiëren voor carcinogeniteit die door deze stoffen geïnduceerd wordt. Echter, soms kan zelfs voor deze stoffen een drempel voor carcinogeniteit geïdentificeerd worden: het is bijvoorbeeld in sommige gevallen duidelijk aangetoond dat een toename in tumoren niet optreedt bij blootstelling beneden niveaus die gepaard gaan met chronische cytotoxiciteit en regeneratieve hyperplasie. Ook voor bepaalde genotoxische carcinogenen bestaat er een praktische drempel voor het onderliggende genotoxische effect.

Niet-genotoxische carcinogenen oefenen hun werking uit via mechanismen die niet directe DNA-activiteit inhouden. Algemeen wordt aangenomen dat deze werkingsmechanismen worden geassocieerd met drempel doseringen, en het kan mogelijk zijn om "no-effect" niveaus van de onderliggende toxische effecten te definiëren. Er zijn veel verschillende werkingsmechanismen waarvan gedacht wordt dat ze betrokken zijn bij niet-genotoxische carcinogeniteit. Bij sommige is directe interactie met specifieke receptoren van toepassing (bijv. oestrogeenreceptoren), terwijl anderen niet receptor-gemedieerd zijn.

De identificatie van het werkingsmechanisme van een carcinogeen is gebaseerd op een combinatie van resultaten in genotoxiciteitstesten (zowel *in vitro* als *in vivo*) en observaties in dierproeven, bijvoorbeeld plaats en aard van de tumor en parallel observaties van pathologische en microscopische analyse. Epidemiologische gegevens dragen zelden bij.

Zodra het werkingsmechanisme van tumorvorming is geïdentificeerd als zijnde met of zonder drempel, moet een dosis descriptor worden afgeleid ten behoeve van chemische veiligheidsbeoordeling. Voor mechanismen met een drempel wordt de "No Observed Adverse Effect Level" (NOAEL) of "Lowest Observed Adverse Effect Level" (LOAEL) voor tumorvorming of voor het onderliggende (toxisch) effect vastgesteld om de "Derived No Effect Level" (DNEL) af te leiden, die vervolgens wordt gebruikt in de veiligheidsbeoordeling om veilige blootstellingsniveaus vast te stellen.

Als het werkingsmechanisme van tumorvorming wordt geïdentificeerd als zijnde zonder drempel, moeten dosis descriptors worden vastgesteld, die het afleiden van een zogenaamde "Derived Minimal Effect Level" (DMEL) mogelijk maken. Deze worden vervolgens gebruikt in de veiligheidsbeoordeling om blootstellingsniveaus van "minimal concern" vast te stellen.

4.5 Geïntegreerde teststrategie (ITS)

Deze strategie heeft tot doel te beschrijven hoe carcinogeniteit moet worden beoordeeld voor alle stoffen waarvoor registratie onder REACH geldt. Dit om stoffen met carcinogene eigenschappen te identificeren, het bijbehorende onderliggende werkingsmechanisme en hun potentie. De "guidance" is vooral bedoeld voor die stoffen waarvoor epidemiologische of toxicologische gegevens over carcinogeniteit ontbreken.

De strategie geeft argumenten voor de beslissing of een standaard carcinogeniciteitsstudie of ander verder onderzoek nodig is. Standaard carcinogeniciteitstesten kosten veel tijd en geld en betekenen het gebruik van een groot aantal dieren. Daarom heeft het de voorkeur dat beslissingen over de mogelijke carcinogene eigenschappen van stoffen in REACH zo vaak mogelijk worden genomen zonder het uitvoeren van dergelijke testen.

De beschikbare informatie zal verschillen van stof tot stof. Dit kan verschillende soorten informatie over toxiciteit van de stof en/of analogen/structuurverwante chemische stoffen bevatten. Details over het gebruik en de potentiële blootstelling van de mens aan de stof zal ook beschikbaar zijn. Dit alles zal een effect hebben op de noodzaak van het verkrijgen van meer data. Voorstellen voor het uitvoeren van een carcinogeniciteitstest moeten worden gemaakt met betrekking tot het mogelijke risico voor de gezondheid van de mens, rekening houdend met de huidige of geplande productie en/of het gebruikspatroon.

REACH schrijft alleen een carcinogeniciteitstest voor bij een niveau ≥ 1000 ton/jaar. Maar REACH vereist ook dat kankerverwekkende stoffen voor alle tonnage niveaus worden geïdentificeerd als "substances of high concern", rekening houdend met informatie uit alle beschikbare bronnen.

Voor niveaus < 1000 ton/jaar, is de belangrijkste zorg de stoffen die genotoxisch zijn. Chemische stoffen kunnen kanker veroorzaken die secundair is aan andere vormen van toxiciteit, maar bescherming tegen onderliggende toxiciteit (bijv. zoals geïdentificeerd in een "repeated-dose" toxiciteitsstudie) zal ook beschermen tegen kanker die secundair is aan die toxiciteit. Opgemerkt wordt echter dat sommige van deze niet-genotoxische carcinogenen, wanneer ze niet geclassificeerd zijn voor enige andere eigenschap en niet als zodanig geïdentificeerd zijn in (beperkte) "repeated-dose" toxiciteitsstudies ongeïdentificeerd zullen blijven. Dit betreft ook de risico's van blootstelling van de mens.

Carcinogenese is een complex "multi-step" proces. Chemisch geïnduceerde kanker kan geïnduceerd worden door veel verschillende "pathways" of werkingsmechanismen en dit zorgt voor een verscheidenheid aan benaderingen voor het vaststellen van carcinogeniteit. Stoffen die als genotoxisch carcinogeen werken, kunnen worden geïdentificeerd door *in vitro* en *in vivo* mutageniteitstesten. Carcinogene stoffen met een niet-genotoxisch werkingsmechanisme zijn moeilijker te identificeren, omdat vergelijkbare, goed gevalideerde, korte-termijn testen voor de potentieel talrijke werkingsmechanismen over het algemeen niet beschikbaar zijn, en de testen die beschikbaar zijn niet vereist worden als onderdeel van de standaard informatievereisten van REACH.

Voor stoffen waarvoor er geen "concern" bestaat over mutagene activiteit en geen andere toxicologische indicatoren van "concern" over carcinogeniteit (d.w.z. voor de stof zelf of voor structureel verwante stoffen), is er geen noodzaak voor het verder overwegen van carcinogeniteit. Dit geldt in gelijke mate voor stoffen op het niveau ≥ 1000 ton/jaar en degenen met een lager niveau.

Indien er echter voor niet-genotoxische stoffen, toxicologische indicatoren van "concern" beschikbaar zijn (bijv. hyperplastische of pre-neoplastische lesies in "repeated-dose" toxiciteitsstudies van de stof zelf en/of van nauw verwante stoffen), moeten ze verder worden onderzocht op individuele basis. Elke beslissing over verder testen is afhankelijk van het type en het gewicht van de aanwijzingen voor carcinogeniteit, het mogelijke werkingsmechanisme en de relevantie voor de mens, en het type en niveau van blootstelling van de mens.

Als er geen conclusie kan worden getrokken over de mogelijke genotoxiciteit van de stof, zal van geval tot geval worden bepaald wanneer en hoe de carcinogeniteit verder moet worden onderzocht. Ook dit hangt dan af van het type en gewicht van de aanwijzingen voor carcinogeniteit, het potentieel werkingsmechanisme(n) en het type en de mate van blootstelling van de mens.

Althans voor stoffen op hogere tonnage niveaus, kunnen subchronische en/of chronische studies aanvullende informatie geven over mogelijke kankerverwekkende effecten. Er kunnen bijvoorbeeld indicaties zijn voor peroxisomale proliferatie of hyperplastische of pre-neoplastische reacties, inclusief dosis-response karakteristieken. Deze moeten verder worden onderzocht op de boven vermelde individuele basis.

Het kan soms doelmatig zijn om andere testen voor te stellen, bijvoorbeeld "read-across" met beschikbare "non-testing" gegevens. Deze kunnen kortdurende testen inhouden, zoals *in vitro* celtransformatie of celproliferatie, of middellange-termijn testen, zoals genetisch gemanipuleerde (transgene) of neonatale diermodellen. De kans is groot dat de op deze manier verkregen gegevens "read-across" naar beschikbare "non-testing" gegevens ondersteunt en voldoende vertrouwen geeft in een met "read-across" afgeleide schatting van de carcinogene potentie van de stof en in de omvang van de risico's die verbonden zijn met de blootstellingsniveaus. De gegevens kunnen echter ook de

basis voor "read-across" verzwakken of zelfs weerleggen. De hiermee opgedane ervaring is erg beperkt.

Gevalideerde testprocedures zijn nog niet beschikbaar in het OECD testrichtlijn programma. Het is daarom belangrijk dat deskundig advies wordt gevraagd over de toepassing en de geschiktheid van één van deze testen.

Voor stoffen op het niveau ≥ 1000 ton/jaar, moet de noodzaak voor of het afzien van een standaard dierproef duidelijk worden uitgelegd, rekening houdend met alle beschikbare informatie over toxiciteit en blootstelling. Als bijvoorbeeld kan worden aangetoond dat humane blootstelling verwaarloosbaar is, is het mogelijk om geen verder onderzoek naar carcinogeniteit voor te stellen.

Het wordt aanbevolen om wanneer een carcinogeniteit bioassay vereist is, onderzoeksopzet en testprotocol goed te overwegen voorafgaand aan het testvoorstel (bijv. OECD TG 453). Bijzondere aandacht moet worden gegeven aan de keuze van de soort en stam, de blootstellingsroute en de dosis selectie. Ook wordt aanbevolen dat wanneer een carcinogeniteitstest zal worden uitgevoerd, een onderzoek naar chronische toxiciteit deel uitmaakt van het studieprotocol.

5 Is een kortere test met minder dieren geschikt voor het vaststellen van kankerverwekkende eigenschappen van chemische stoffen?

Een nauwkeurige beoordeling van de mogelijke carcinogeniteit van chemische stoffen is essentieel. Daarom worden veel stoffen uitgebreid getest voordat ze op de markt komen. Op dit moment wordt de 2-jaars knaagdier test ("life-time" dierproef) gebruikt ter beoordeling van de mogelijke carcinogeniteit van stoffen. Door de jaren heen is het echter duidelijk geworden dat deze bepaling veel vals-positieve resultaten oplevert en ook verschillende ethische en economische nadelen heeft, zoals het gebruik van grote aantallen dieren, de lange duur en de hoge kosten. De noodzaak voor een geschikte alternatieve test is dan ook groot.

Een alternatieve benadering om de mogelijke carcinogeniteit van stoffen te bepalen is het gebruik van gegevens uit "repeated-dose" toxiciteitsstudies. Histopathologische parameters gecombineerd met gegevens over genotoxiciteit zijn wellicht nuttig als vroege indicatoren voor de identificatie van carcinogene stoffen. Deze aanpak is eerder getest op gegevens over geneesmiddelen². Retrospectief is nagegaan wat de meerwaarde is van een 2-jaars carcinogeniteitsstudie ten opzichte van een 12-maanden chronische toxiciteitsstudie. De resultaten van dat onderzoek tonen aan dat het uitvoeren van een rat 2-jaars carcinogeniteitsstudie weinig toegevoegde waarde heeft voor verbindingen die geen van de volgende effecten laten zien: (1) histopathologische risicofactoren voor neoplasie bij chronische toxiciteitsstudies, (2) hormonale verstoring en (3) genetische toxiciteit. Deze analyses ondersteunen verfijning van de criteria voor het uitvoeren van een rat 2-jaars carcinogeniteitsstudie, gebaseerd op histopathologie van een rat 6-maanden studie, bewijs van hormonale verstoring, resultaten van genetische toxicologie en een 6-maanden transgene muis carcinogeniteitsstudie. Deze aanpassing heeft de potentie om meer dan 40 % van de rat 2-jaars carcinogeniteitsstudies te voorkomen voor nieuwe geneesmiddelen zonder compromissen aan patiëntveiligheid.

In het SLiM-project werd deze aanpak uitgebreid en toegepast op gegevens van 3-maanden "repeated-dose" toxiciteitsstudies. Het doel van het project is om te onderzoeken of een NOAEL of "benchmark dose" (BMD)³ kan worden afgeleid zonder een 2-jaar studie uit te voeren, met behulp van gegevens uit een 3- of 6-maanden "repeated-dose" toxiciteitsstudie, gevolgd door toepassing van passende onzekerheidsfactoren.

Gegevens over meer dan 200 chemische stoffen zijn verzameld uit openbaar beschikbare databases. Een database werd gebouwd, die informatie bevat over de chemische stoffen en de gegevens van toxiciteitsstudies: de rattenstam die werd gebruikt, lichaams- en orgaangewichten, histopathologische bevindingen en gegevens over genotoxiciteit. De data analyse is op dit moment nog gaande.

6 Leidraad ten behoeve van andere domeinen

Het eerste doel van dit briefrapport is om op basis van de in SLiM verworven inzichten een leidraad ten behoeve van andere domeinen op te stellen, zowel inhoudelijk als procesmatig.

Voor het project ontwikkelingstoxiciteit geldt dat de database is opgezet met chemische stoffen en nu wordt gevuld met geneesmiddelen. Voor het project carcinogenese geldt dat de database nu wordt gevuld met chemische stoffen en nadien zal worden gevuld met geneesmiddelen. In ieder geval voorkomt deze methode dubbel werk bij het opzetten en inrichten van de databases. Daarnaast kan kennis opgedaan in het ene domein gebruikt worden in het andere domein. De domeinen hebben niet alleen andere regelgevende gremia, deze gremia hanteren ook andere werkwijzen t.a.v. 3V ketens⁵.

Door vanaf het begin van het SLiM project overheid, regelgevers en industrie uit de voorgestelde projecten te laten kiezen en ze vervolgens blijvend erbij te betrekken, is de kans op succesvolle acceptatie en implementatie op nationaal niveau maximaal. Regelgeving wordt op internationaal niveau vastgesteld, dus deze kansen waren nog groter geweest als we op dat niveau hadden kunnen opereren. Dit lag echter ver buiten de mogelijkheden van de financiers.

Beide projecten vallen onder "regulatory learning", dat wil zeggen dat een retrospectieve analyse van bestaande proefdiergegevens belangrijke input kan geven om tot vermindering en verfijning van dierproeven te komen. In de ontwikkelingstoxicologie vermindering door i.p.v. twee species er (in bepaalde gevallen) slechts één te gebruiken, mogelijk gesteund door *in vitro* data en in de carcinogeniteit vermindering en verfijning door het niet meer uitvoeren van de carcinogeniteit bioassay en uitsluitend gebruik te maken van 90-dagen studies die toch al worden uitgevoerd.

"Regulatory learning" is een belangrijke methode binnen de 3V: door gebruik te maken van bestaande gegevens en deze op een gedegen maar ook slimme manier te analyseren, uitgaande van wetenschappelijke kennis en aangevuld met werkhypothesen kunnen slagen gemaakt worden met relatief bescheiden middelen. Hiervoor is het erg belangrijk de industrie erbij te betrekken door voor hen de duidelijke meerwaarde aan te geven i.v.m. vrijmaken van gegevens en acceptatie in de regelgeving.

6.1 Conclusies

"Regulatory learning" is een veelbelovende methode om te komen tot mogelijke vermindering en verfijning van dierproeven. Een in het ene domein ontwikkelde aanpak kan ook in andere domeinen gebruikt worden. "Regulatory learning" lijkt gunstig om industriële partners te betrekken; andersom kan deze methode profiteren van het inbrengen van data door deze partners. Alle ketenpartners moeten in alle fasen van het validatie/acceptatie/implementatie proces betrokken zijn.

7 Intermediaire rol van het RIVM

Het tweede doel van dit briefrapport is aan te geven hoe de intermediaire rol van het RIVM in de keten m.b.t. implementatie, in SLiM en in toekomstige activiteiten in de keten, versterkt ingezet kan worden, zowel inhoudelijk als procesmatig.

Om de rol van het RIVM in de keten goed te kunnen duiden zijn de missie en taken van het RIVM op het gebied van 3V beschreven. Tevens zijn de ambities en zwaartepunten beschreven. Voor de volledige tekst wordt verwezen naar het rapport⁶.

7.1 Missie en taken op het gebied van 3V

Het RIVM is vanuit haar publieke taken sterk betrokken bij zowel onderzoek als (inter-) nationale advisering op het gebied van validatie, acceptatie en implementatie van alternatieven voor dierproeven en ondersteunt op deze manier meerdere departementen en toezichthouders.

De kennis en expertise van het RIVM worden ingezet om internationaal de acceptatie en implementatie van wetenschappelijk onderbouwde én risicogestuurde 3V-alternatieven in de reguliere beoordelingskaders te stimuleren. Hiervoor is een integrale benadering vereist en het RIVM bundelt daartoe expertise vanuit verschillende disciplines en werkvelden.

De verschillende rollen van het RIVM in dit proces zijn: (het domein vaccins is hier niet opgenomen omdat deze geen deel uitmaakt van SLiM of van één van de onder SLiM vallende projecten)

Rol 1: Kennisleverancier en onderzoeker

Het RIVM genereert kennis door het uitvoeren van eigen onderzoek en door kennisverzameling en -integratie.

Rol 2: Signaleren van (inter)nationale ontwikkelingen

RIVM experts participeren in diverse (inter-)nationale werkgroepen die zich bezighouden met wettelijke richtlijnen voor toelating van chemische stoffen en geneesmiddelen. In deze gremia wordt op (inter-)nationaal niveau gesproken over implementatie van 3V-alternatieven of mogelijkheden om het proefdiergebruik te verminderen, bijvoorbeeld door harmonisatie van richtlijnen of aanpassing van richtlijnen waardoor dierproeven voorkomen kunnen worden. In dergelijke gremia en adviescommissies wordt niet alleen kennis ingebracht en verkregen maar worden ook beleidsrelevante trends gesignaleerd.

Rol 3: Beleidsadvisering en ondersteuning

Het RIVM adviseert verschillende ministeries over ontwikkelingen en inzet op het gebied van 3V-alternatieven in de wettelijke kaders. Beleidsadvisering en ondersteuning betreffen onder andere de consequenties voor de risicobeoordeling wanneer 3V-alternatieven worden geïmplementeerd in de verschillende wettelijke kaders, implementatie van de 3V's in OECD richtlijnen, werkzaamheden in het REACH kader en signaleren van kansen en belemmeringen voor acceptatie en implementatie van 3V-alternatieven.

Rol 4: Uitvoerder van wettelijke taken

De risicobeoordeling van chemische stoffen wordt op het RIVM uitgevoerd. Ook is het RIVM belast met de preklinische kinetiek en milieubeoordelingen van geneesmiddelen. De beoordeling voor marktoelating van geneesmiddelen wordt uitgevoerd door het CBG. Kennis over wettelijke richtlijnen en testsystemen, inclusief 3V-alternatieven, in regelgevende kaders is essentieel om deze taak te kunnen uitvoeren.

Rol 5: (Inter-)nationale acceptatie en implementatie van 3V-alternatieven bevorderen

De zogenoemde ketenbenadering geeft de verschillende fasen weer die een rol spelen in het traject van ontwikkeling van een 3V methode tot internationale acceptatie en implementatie.

Samenwerking tussen de partijen die in dit traject actief zijn is essentieel om efficiënt door de keten te gaan. Daarbij is het van belang in een vroeg stadium te toetsen of een test of een combinatie van testen toepasbaar is binnen een regelgevend beoordelingskader. De aanwezigheid van zowel onderzoekers die 3V-alternatieven ontwikkelen en operationaliseren als risicobeoordelaars die de toepasbaarheid van 3V-alternatieven in verschillende testrichtlijnen kunnen beoordelen geeft het RIVM een unieke positie om in (inter-)nationale werkgroepen acceptatie en implementatie van 3V testen te stimuleren.

7.2 Ambities

Op het gebied van 3V-alternatieven heeft het RIVM de volgende ambities:

1. Nationaal en internationaal gezaghebbend zijn in het traject van acceptatie en implementatie van 3V-alternatieven.

2. Kennis aanwezig in de domeinen chemische stoffen en medische producten in de breedte van het RIVM benutten om zoveel mogelijk synergie te creëren.

Om de ambities te kunnen verwezenlijken is het noodzakelijk om te prioriteren en focuseren. Er zal ingezet worden op zwaartepunten die passen binnen de publieke taken van het RIVM en die kansrijk worden geacht vanwege de aanwezige kennisbasis, (inter-)nationale reputatie en netwerk. De gekozen zwaartepunten passen bij twee thema's die het NKCA heeft aangemerkt als prioritaire kennisdomeinen in haar Programmeringsstudie^{7,8}: Toegepast onderzoek naar de risicobeoordeling van chemische stoffen en Toegepast onderzoek naar de kwaliteitsbewaking van geneesmiddelen, inclusief sera en vaccins. Voor chemische stoffen en geneesmiddelen zijn gezamenlijke zwaartepunten vastgesteld, waardoor kansen ontstaan om deze domeinen te verbinden. Waar nodig voert RIVM eigen onderzoek uit binnen de kaders van deze zwaartepunten.

Voortvloeiend uit de ambities geldt voor alle zwaartepunten dat het RIVM zich in haar internationale adviseringstaken actief zal inzetten voor aanpassing van de richtlijnen om acceptatie en implementatie van kansrijke risico-gestuurde 3V-alternatieven te bevorderen.

7.3 Zwaartepunten

1. Reproductietoxiciteit

De reputatie op dit gebied is goed mede door de succesvolle acceptatie van het EOGRTS protocol door de OECD. Er is sprake van een uitgebreid internationaal netwerk, een goede kennisbasis, een rol in zowel kennis genererend als - integrerend onderzoek en in internationale advisering.

2. Integrated Testing Strategies

Het is onwaarschijnlijk dat dierproeven één op één vervangen worden door een enkele 3V methode.

In de toekomst zal het slim combineren van gegevens uit proefdierstudies, *in vitro* testen, non-testing methoden (mathematische modellen, (Q)SARs, read-across en groeperingsmethoden), humane data, fysisch-chemische eigenschappen en blootstellingsstudies leiden tot een ITS die gebruikt wordt om tot een conclusie te komen over het veilig gebruik van stoffen op basis van kwalitatieve of kwantitatieve wegingsmethoden. De inzet van ITS wordt als zeer kansrijk gezien in de risicobeoordeling van chemische stoffen en geneesmiddelen. In de komende jaren zal het RIVM zich nadrukkelijk richten op

de mogelijke plaats van een betreffende test in de gehele teststrategie zowel binnen onderzoek als advisering.

3. Regulatory learning

Bij de risicobeoordeling van chemische stoffen en geneesmiddelen wordt al enkele decennia gebruik gemaakt van wereldwijd gestandaardiseerde proefdierstudies, teststrategieën en methoden voor risico-evaluatie. Dat heeft een schat aan informatie opgeleverd, die gebruikt kan worden voor een retrospectieve analyse van het functioneren van dit systeem. Dergelijke analyses worden in toenemende mate toegepast om vast te stellen of verbeteringen in methoden en procedures kunnen worden aangebracht die efficiency verhogen, kosten drukken, en proefdiergebruik beperken.

7.4 Conclusies

De beide binnen SLiM uitgevoerde onderzoeksprojecten ontwikkelingstoxiciteit en carcinogeniteit passen goed in de RIVM strategie:

1. Beide projecten vallen binnen het geneesmiddelen- en het chemische stoffendomein; deze domeinen kunnen elkaar versterken (synergie). Binnen het SLiM project betreffen de projecten ontwikkelingstoxiciteit en carcinogeniteit de domeinen geneesmiddelen resp. chemische stoffen; buiten het SLiM project chemische stoffen resp. geneesmiddelen (dus andersom).
2. Beide projecten hebben een sterke basis in wetenschap en regelgevende kaders; dit geldt voor het domein geneesmiddelen en het domein chemische stoffen.
3. Beide projecten vallen onder het RIVM zwaartepunt "Regulatory learning".
4. Het project ontwikkelingstoxicologie valt binnen de RIVM zwaartepunten "Reproductietoxiciteit" en "Integrated Testing Strategies" (ITS). Ten aanzien van het laatste: er zal worden nagegaan of de muis embryonale stamcel test (mEST) ingezet kan worden om tot een ITS te komen, die op termijn tot een verdere vermindering van het testen van de tweede species moet leiden.

De slotconclusie is dat het RIVM, vanwege haar strategie en ambitie, vanwege haar rol in zowel het geneesmiddelen- en stoffendomein, en vanwege haar basis in zowel wetenschap en regelgevende kaders, in beide projecten een belangrijke intermediaire rol kan spelen resp. heeft gespeeld. Het RIVM zou in toekomstige, vergelijkbare projecten zoveel mogelijk deze rol op zich moeten nemen.

8 Referenties

- ¹International Life Sciences Institute - Health and Environmental Sciences Institute working group on Developmental And Reproductive Toxicity"
- ²Sistare FD, Morton D, Alden C, Christensen J, Keller D, Jonghe SD, Storer RD, Reddy MV, Kraynak A, Trela B, Bienvenu JG, Bjurström S, Bosmans V, Brewster D, Colman K, Dominick M, Evans J, Hailey JR, Kinter L, Liu M, Mahrt C, Marien D, Myer J, Perry R, Potenta D, Roth A, Sherratt P, Singer T, Slim R, Soper K, Fransson-Steen R, Stoltz J, Turner O, Turnquist S, van Heerden M, Woicke J, DeGeorge JJ. An analysis of pharmaceutical experience with decades of rat carcinogenicity testing: support for a proposal to modify current regulatory guidelines. *Toxicol Pathol.* 2011;39(4):716-44.
- ³NOAEL resp. BMD zijn doseringen waarbij nog geen toxisch effect optreedt resp. een in grootte bepaald toxisch effect plaatsvindt.
- ⁴R.J. Vandebriel, J.W. van der Laan, A.H. Piersma. Knelpunten in de keten van 3V-testen voor ontwikkelings- en reproductietoxiciteit. Plan van Aanpak. RIVM briefrapport 340008002/2012.
- ⁵R.J. Vandebriel, A. Opperhuizen. Knelpunten bij de ontwikkeling, validatie en implementatie van Alternatieven voor Dierproeven. RIVM rapport 340720005/2011.
- ⁶J. Ezendam. Alternatieven voor dierproeven op het RIVM. RIVM rapport 340012001/2012.
- ⁷S.A.M. Deleu, M.M.F. van Boxel, D.P.K. Lankveld, R.J. Vandebriel, J.G.M. Bessems. Programmeringsstudie Alternatieven voor Dierproeven - Deel 1 Samen vervangen, verminderen en verfijnen. RIVM briefrapport 380001001/2010.
- ⁸S. Deleu, M.M.F. van Boxel. Programmeringsstudie Alternatieven voor Dierproeven - Deel 2 Samen vervangen, verminderen en verfijnen. RIVM rapport 380001002/2011.

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag