



Bündnis 90/Die Grünen Alternativmethoden zu Tierversuchen

Fachgespräch im Bayerischen Landtag
17. Oktober 2014

**"Alternativmethoden zu Tierversuchen –
eine Erfolgsgeschichte, die noch nicht zuende ist"**

Dr. med. Horst Spielmann
Professor für Regulatorische Toxikologie
FU Berlin
& Landestierschutzbeauftragter



Der Tierschutzbeauftragte des Landes Berlin

Berlin - ehrenamtlicher Tierschutzbeauftragter,
Amt ist nur in wenigen Bundesländern vorhanden

Prof. Horst Spielmann

wurde im Dezember 2012 zum Tierschutzbeauftragten des
Landes Berlin berufen,

Aufgaben des Tierschutzbeauftragten des Landes Berlin

- **Beratung** der für den Tierschutz zuständigen Senatsverwaltung für Justiz und Verbraucherschutz in allen Fragen des Tierschutzes, insbesondere bei **Rechtssetzungsvorhaben des Landes und des Bundes** und im Falle von **Beschwerden von Bürgern** über Verstöße gegen das Tierschutzrecht
- Erarbeitung von **Stellungnahmen zu speziellen Tierschutzfragen** für die für Tierschutz zuständigen **Berliner Behörden**
- Unterbreitung von **Vorschlägen** und Erarbeitung von Initiativen **zur Verbesserung des Tierschutzes** in Berlin
- **Ansprechpartner** für Bürgerinnen und Bürger sowie Tierschutzorganisationen
- **Information der Öffentlichkeit** über die geleistete Tätigkeit / **Tätigkeitsberichte und Internet** <http://www.berlin.de/lb/tierschutz/>



Definition Alternativmethoden

3Rs-KONZEPT von RUSSEL & BURCH (1959, 1992)

The Principles of Humane Experimental Technique

- **REFINE** **VERBESSERN**
höhere Qualität der Versuche (neue Endpunkte) bei reduziertem Leiden der Tiere
- **REDUCE** **VERMINDERN**
gleiche Qualität der Aussage mit geringerer Tierzahl (Biometrie!)
- **REPLACE** **VERMEIDEN**
vollständiger Ersatz der Tierversuche



RICHTLINIE 2010/63/EU
DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES
vom 22. September 2010
zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere

Artikel 4

Grundsatz der Vermeidung, Verminderung und Verbesserung

Principle of replacement, reduction and refinement (3R-Prinzip)

1. Die Mitgliedstaaten gewährleisten, dass, wo immer dies möglich ist, anstelle eines Verfahrens eine wissenschaftlich zufrieden stellende Methode oder Versuchsstrategie angewendet wird, bei der keine lebenden Tiere verwendet werden.
2. Die Mitgliedstaaten gewährleisten, dass die Anzahl der in Projekten verwendeten Versuchstiere auf ein Minimum reduziert wird, ohne dass die Ziele des Projekts beeinträchtigt werden.
3. Die Mitgliedstaaten gewährleisten, dass die Zucht, Unterbringung und Pflege sowie die Methoden, die in Verfahren angewandt werden, verbessert werden, damit mögliche Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden ausgeschaltet oder auf ein Minimum reduziert werden.
4. In Bezug auf die Wahl der Methoden wird dieser Artikel im Einklang mit Artikel 13 angewendet.



RICHTLINIE 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES

vom 22. September 2010

zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere

Artikel 47

Alternative Ansätze

- (1) Die Kommission und die Mitgliedstaaten tragen zur Entwicklung und Validierung alternativer Ansätze bei, die ohne Verwendung von Tieren den gleichen oder einen größeren Umfang an Informationen liefern könnten wie Verfahren, in denen Tiere verwendet werden, sowie von Ansätzen, die mit weniger Tieren auskommen oder weniger schmerzhaftere Verfahren beinhalten, und unternehmen entsprechende Schritte, die sie für die Förderung der Forschung auf diesem Gebiet als angemessen erachten.

- (4) Die Mitgliedstaaten gewährleisten auf einzelstaatlicher Ebene, dass alternative Ansätze gefördert und die diesbezüglichen Informationen verbreitet werden**

Die Kosmetikindustrie und die 7. Änderung der EU Kosmetik-Richtlinie 2003



- **EU: 2.000 Firmen,
60 Mrd. € Umsatz**
 - **EU: 5.000 neue Produkte pro Jahr,
25% Umsatz mit Produkten,
die in den letzten 6 Monaten
entwickelt wurden**
 - **Verkaufsverbot seit 2003 für Fertigprodukte,
die im Tierversuch getestet wurden**
 - **Beendigung von Tierversuchen und
schrittweises Verkaufsverbot zwischen 2009
and 2013**
- Lösung: Prüfung mit Alternativmethoden**

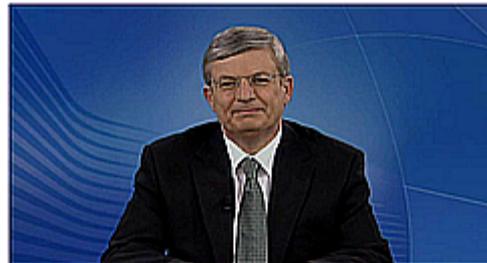
Brüssel, 11. März 2013

Vollständiges EU-Verbot von Tierversuchen für Kosmetika tritt in Kraft

Heute läuft die letzte Frist für die schrittweise Abschaffung von Tierversuchen für Kosmetikprodukte in Europa ab. Ab heute dürfen Kosmetika, die an Tieren getestet wurden, nicht mehr in der EU vermarktet werden.

In einer heute angenommenen Mitteilung bestätigt die Kommission ihr Engagement zur Einhaltung der Frist, die das Europäische Parlament und der Rat 2003 gesetzt haben, und legt dar, wie sie die Forschung und Innovation in diesem Bereich weiterhin unterstützen und gleichzeitig den Tierschutz weltweit fördern will.

Der für Gesundheit und Verbraucherpolitik zuständige EU-Kommissar, Tonio Borg, erklärte: *„Das heutige Inkrafttreten des vollständigen Vermarktungsverbots ist ein wichtiges Signal für den Stellenwert, den Europa dem Tierschutz beimisst. Die Kommission engagiert sich dafür, die Entwicklung alternativer Testverfahren weiterhin zu unterstützen und Drittländer aufzufordern, sich unserer europäischen Vorgehensweise anzuschließen. Dies ist eine große Chance für Europa, ein Beispiel für verantwortungsvolle Innovation im Bereich der Kosmetika zu geben, ohne die Verbrauchersicherheit zu gefährden.“*

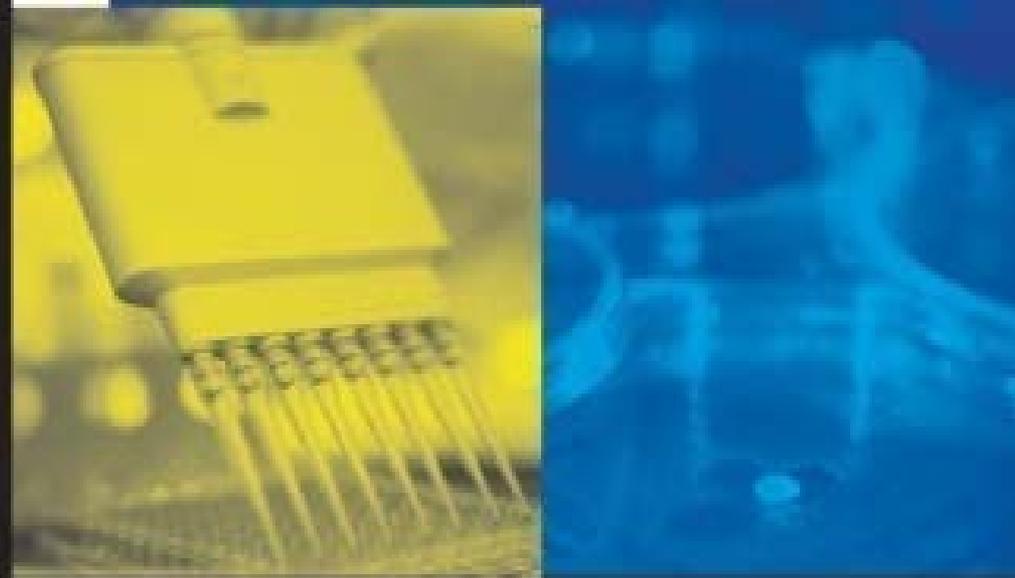


Die Kommission hat die Auswirkungen des Vermarktungsverbots gründlich geprüft und ist zu der Auffassung gelangt, dass es zwingende Gründe für seine Durchsetzung gibt. Dies entspricht der festen Überzeugung vieler europäischer Bürgerinnen und Bürger, dass **die Entwicklung von Kosmetika keine Tierversuche rechtfertigt.**

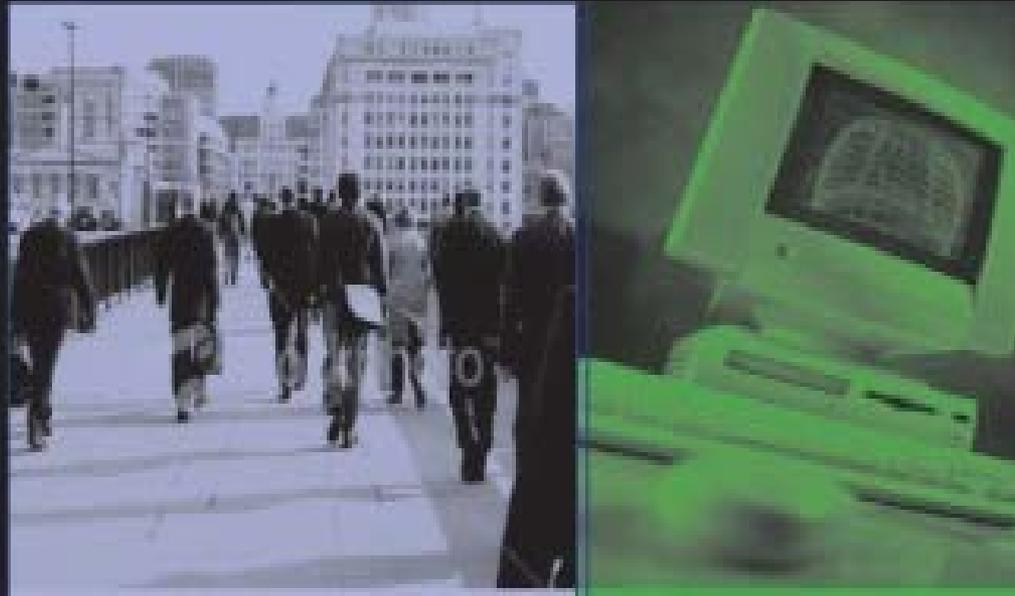
National Academy of Sciences 2007

“..... a not-so-distant future where all routine toxicity testing will be conducted in human cells or cell lines *in vitro* by evaluating perturbations of cellular responses in a suite of toxicity pathway assays.....”

Andersen and Krewski (2009). Toxicity Testing in the 21st Century: Bringing the Vision to Life. *Tox. Sci.*, 107, 324-330.



TOXICITY TESTING IN THE 21ST CENTURY: A VISION AND STRATEGY

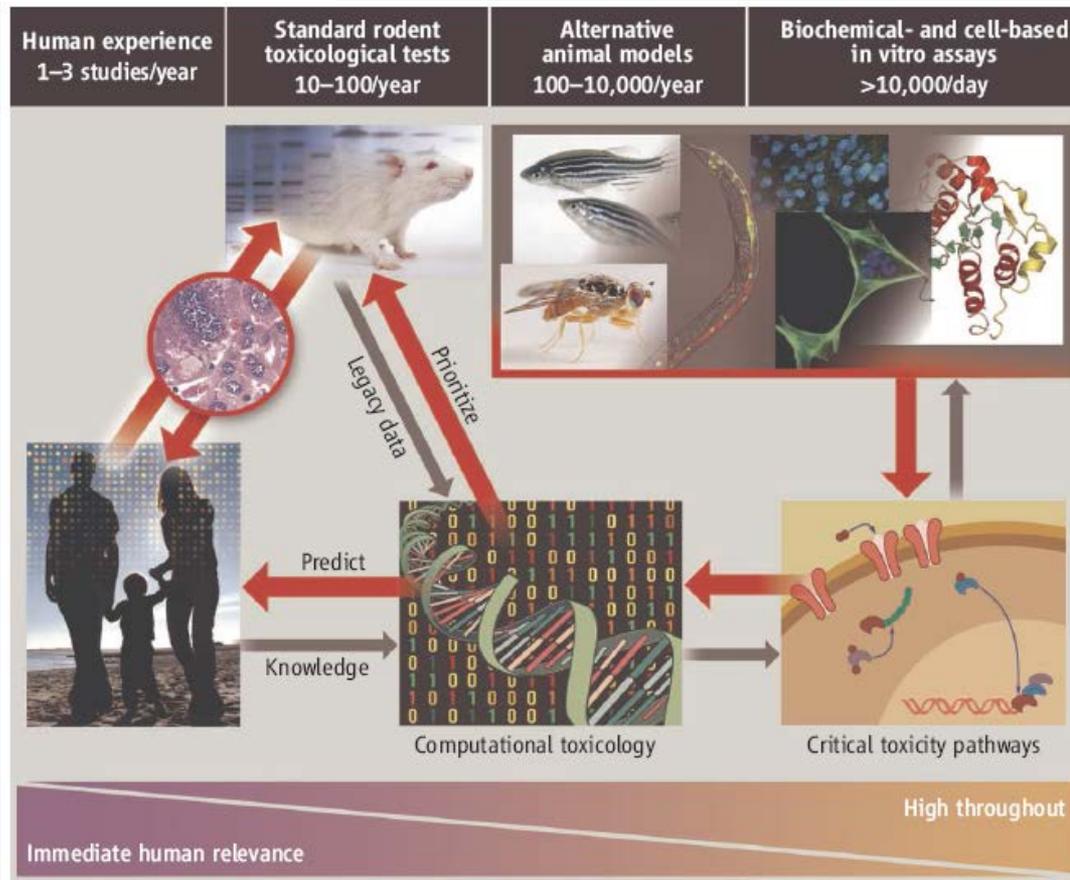


TOXICOLOGY

Transforming Environmental Health Protection

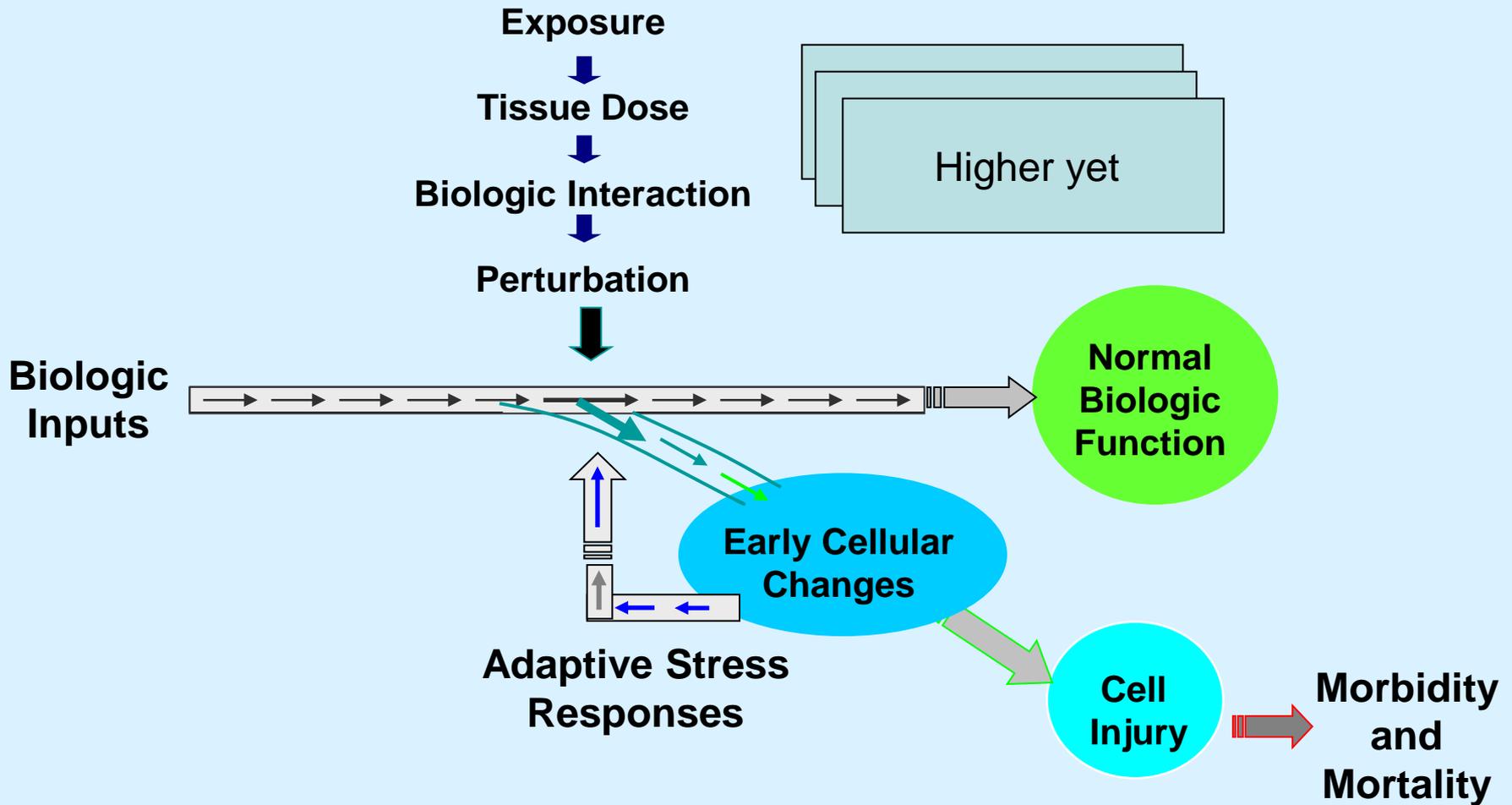
Francis S. Collins,^{1†} George M. Gray,^{2*} John R. Bucher^{3*}

We propose a shift from primarily in vivo animal studies to in vitro assays, in vivo assays with lower organisms, and computational modeling for toxicity assessments.



Transforming toxicology. The studies we propose will test whether high-throughput and computational toxicology approaches can yield data predictive of results from animal toxicity studies, will allow prioritization of chemicals for further testing, and can assist in prediction of risk to humans.

Perturbation of Toxicity Pathways



Molekulare Toxikologie - Pathways

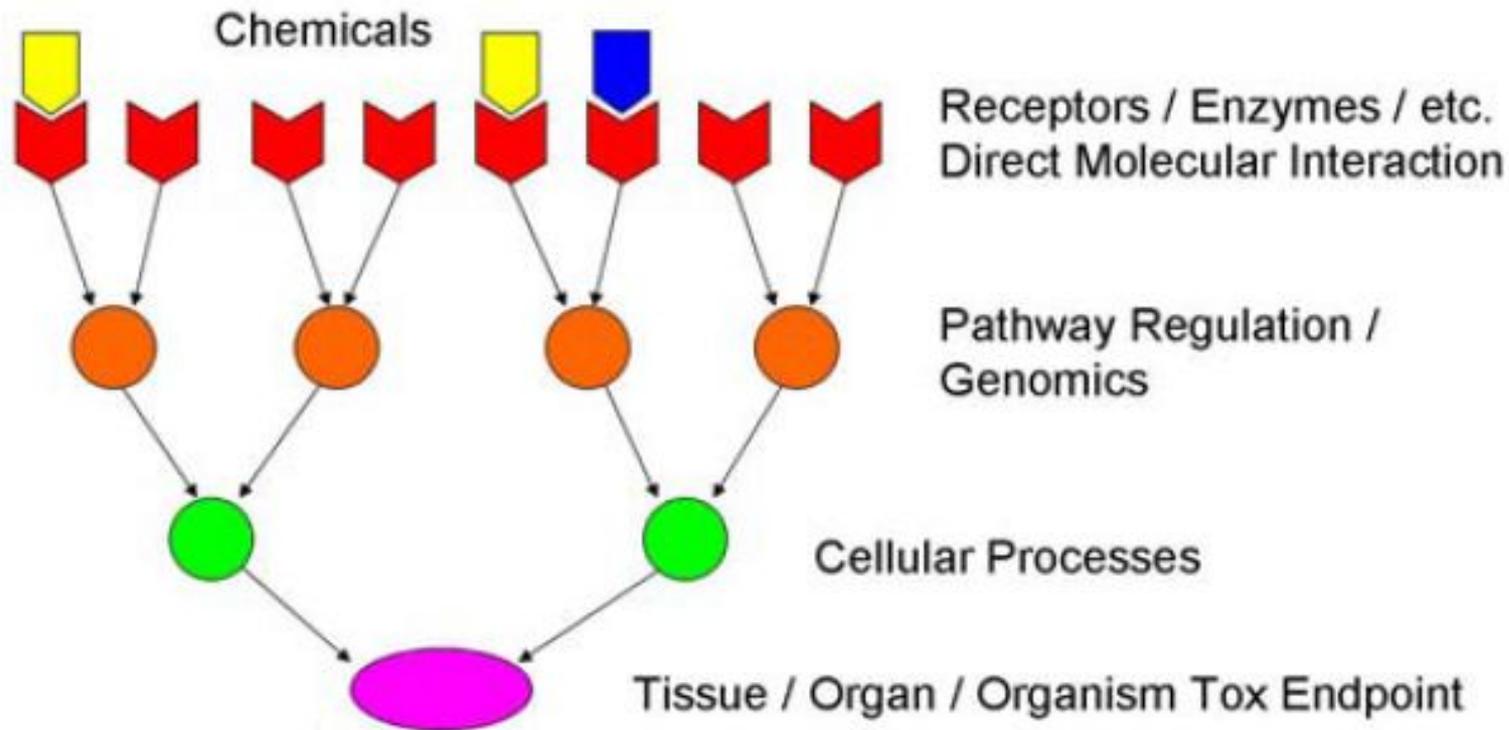
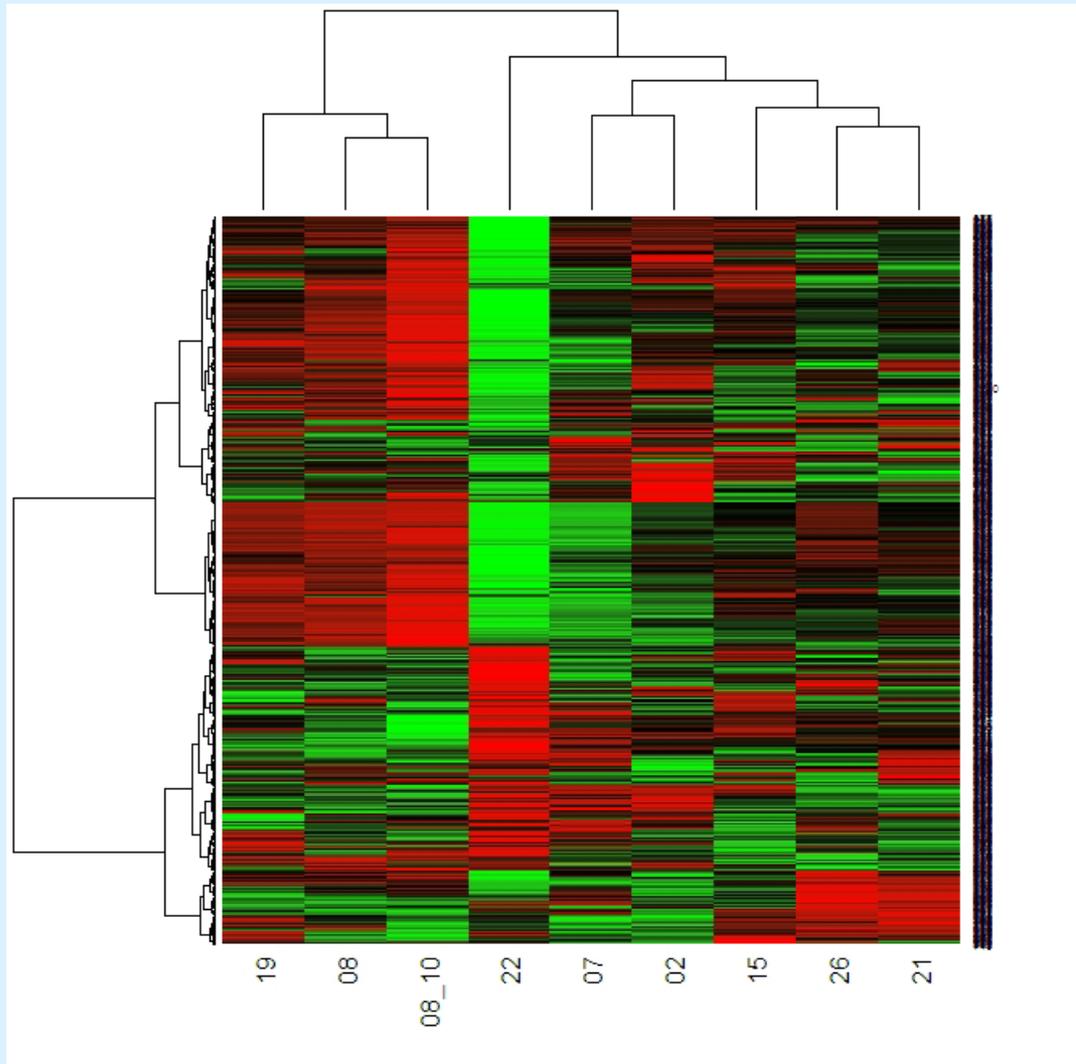


Figure 2. Toxicity Pathways Target Multiple Levels of Biological Organization.

Pathway Testing – toxicogenomics, etc.



**Assess
pathways,
integrate
tissue
responses,
and evaluate
metabolites**

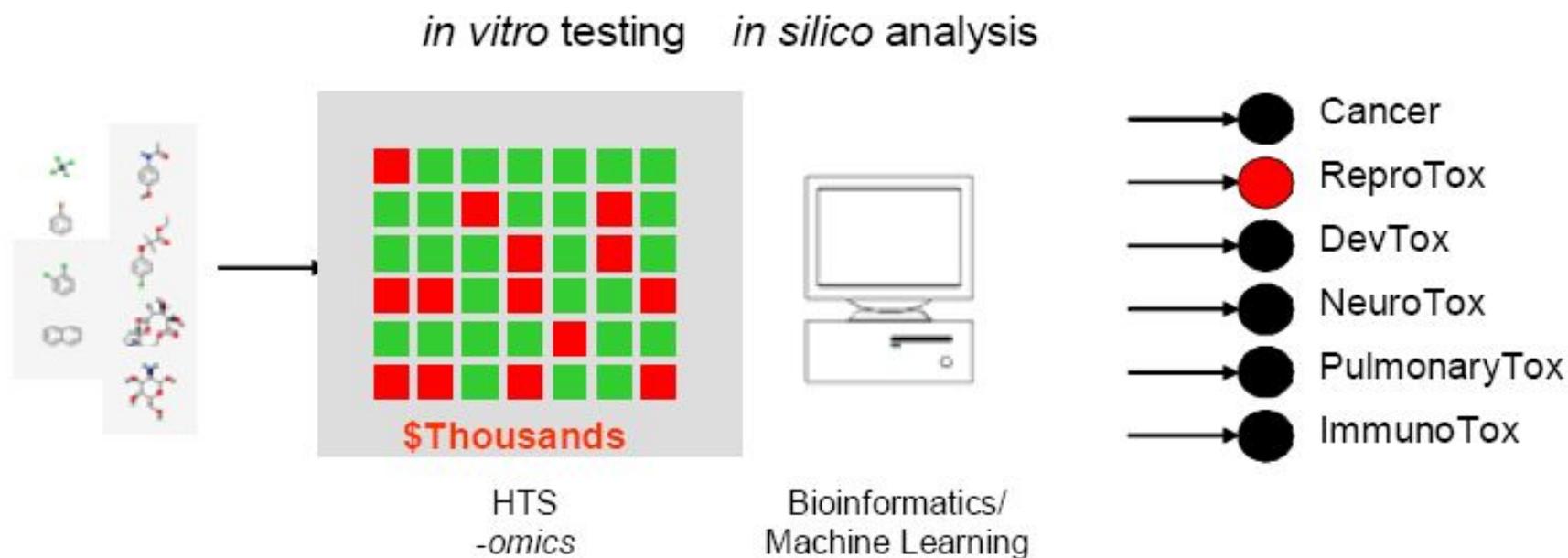
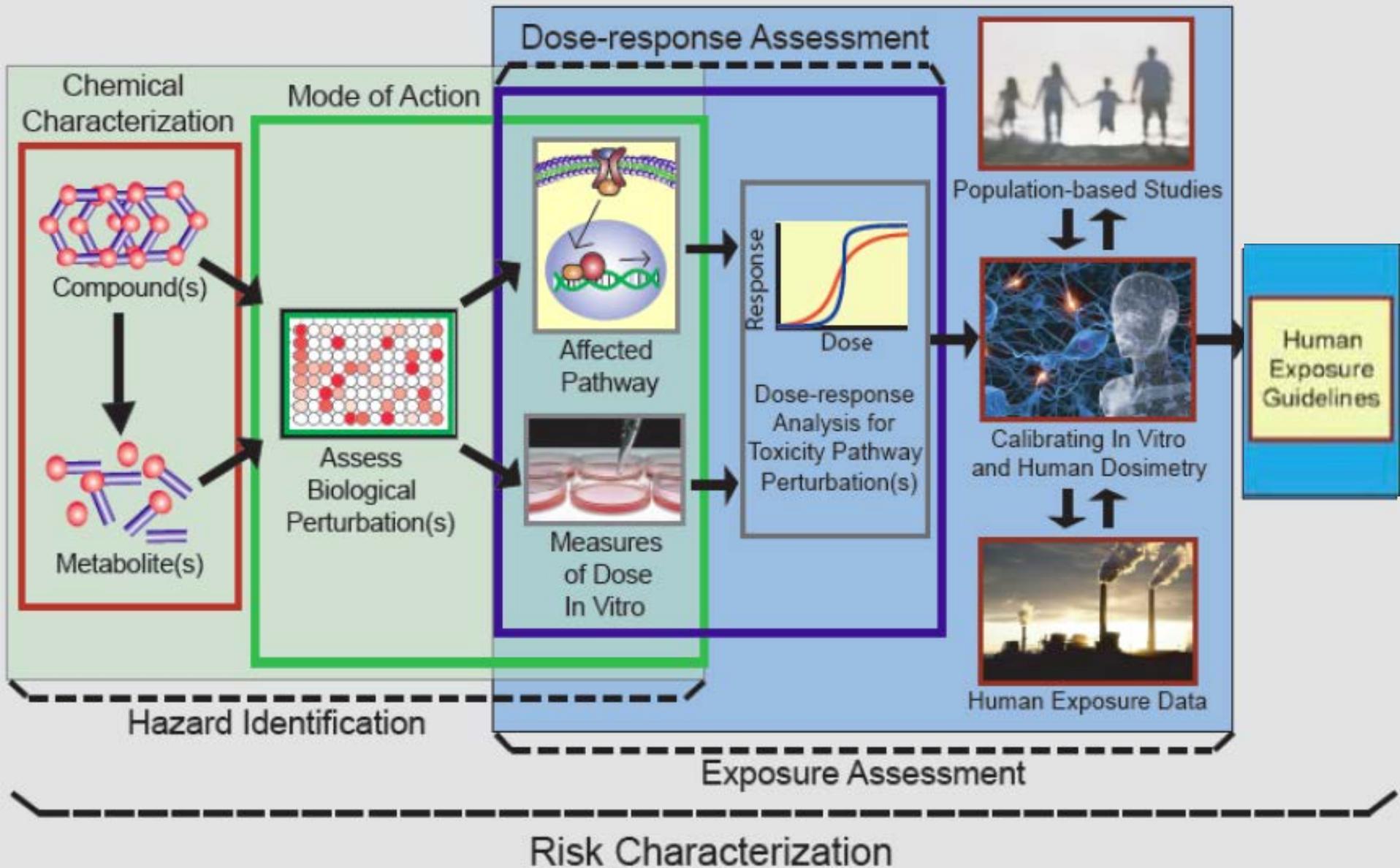


Figure 3. ToxCast™ is using a variety of HTS assays to develop bioactivity signatures that are predictive of effects in traditional toxicity testing approaches.

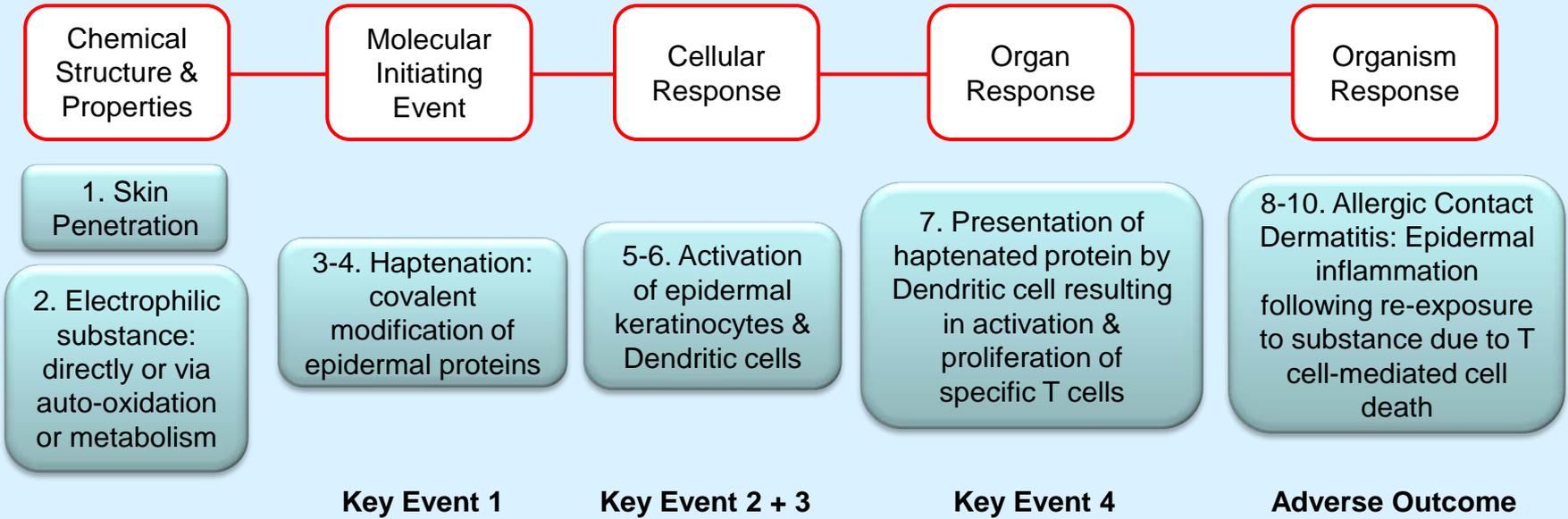
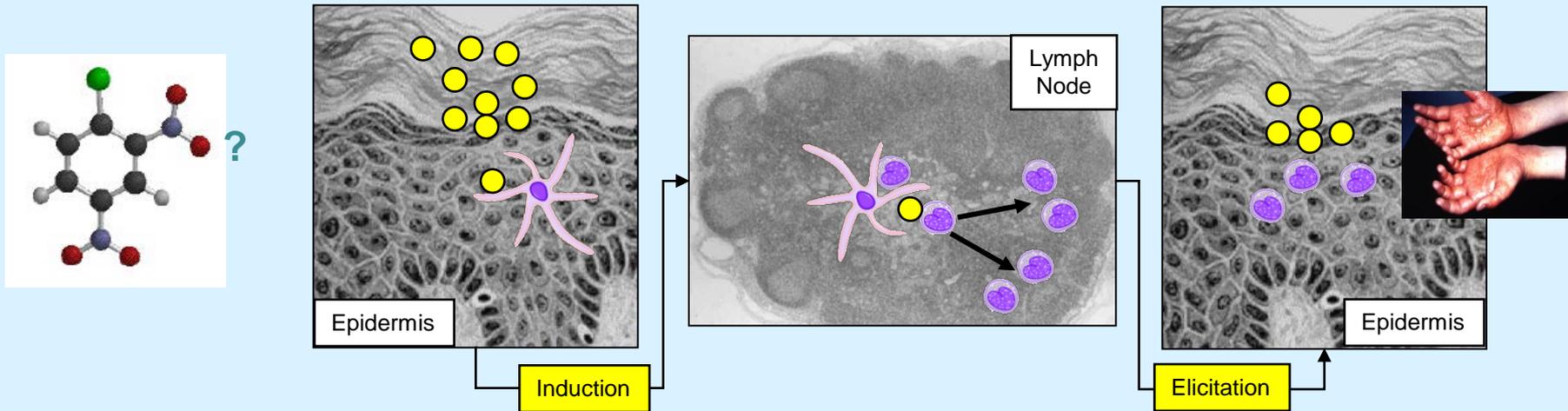
Toxicity Testing and Risk Assessment

(from Krewski et al., 2010, *Annual Review of Public Health*, in press)



OECD 2013: AOP (Adverse Outcome Pathway) Konzept für Sensibilisierung der Haut

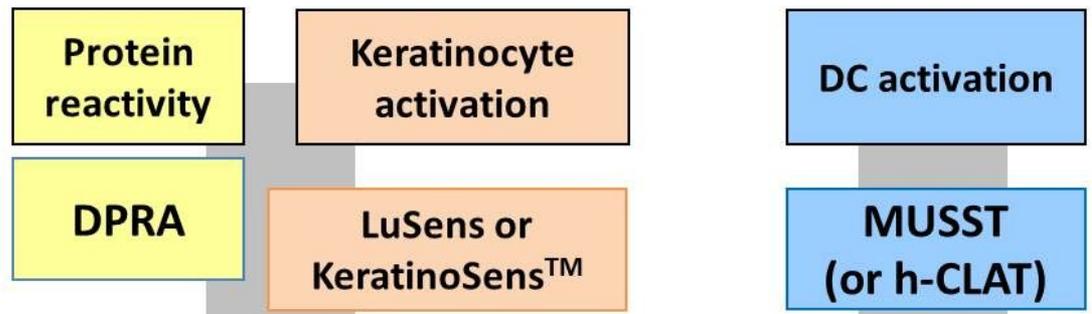
Darstellung der entscheidenden Reaktionsschritte, die zur Reaktion an der Haut führen



Strategie für eine tierversuchsfreie Prüfung auf Hautsensibilisierung durch Kombination von 3 Methoden, die den Adverse Outcome Pathway



Adverse outcome pathway



If both results are negative:
NON-SENSITIZER
 (High Sensitivity, 100%)

If positive:
SENSITIZER
 (High Specificity, 100%)

If: results of protein reactivity and DC activation are contradicting
 Or: the h-CLAT is being used instead of the MUSST assay

Use weight of evidence:
 Results of 2 out of 3 tests determine the overall result
 High Overall Accuracy (94%)

Die BASF reicht bei der EU Chemikalienagentur ECHA seit 2013 nur noch Daten zur Hautsensibilisierung ein, die mit der tierversuchsfreien Methode erzielt wurden und hat den Tierversuch vollständig ersetzt .

Bauch et al.
 Regul. Tox. Pharm
 63, 489-504. 2012

Anstieg der Tierversuchszahlen in Deutschland

► Ursachen??

1. Transgene Tiere

- Zunahme weltweit ein Problem
- insbesondere menschliche Krankheitsmodelle in transgenen Mäusen

2. Krankheitsmodelle

- Herz- und Kreislauferkrankungen
- immunologische Erkrankungen
- Multiple Sklerose
- M. Alzheimer
- Infektionen
- Psychische Erkrankungen & Sucht (Alkohol)
- Krebs & Metastasierung

Es gibt nur wenige praktisch erprobte Alternativmethoden für realistische menschliche Krankheitsmodelle !!

Beispiele: Infektionskrankheiten (Tbc, Candida, Pneumonie)

- Ursachen Stimulierung der „antiinfektiven Proteine“ über „toll-like“ Rezeptoren ist bei Maus und Mensch unterschiedlich !

KONSEQUENZ:

molekulare Pharmakologie und Toxikologie mit menschlichen Zellen und Geweben ► BEISPIEL HAUT

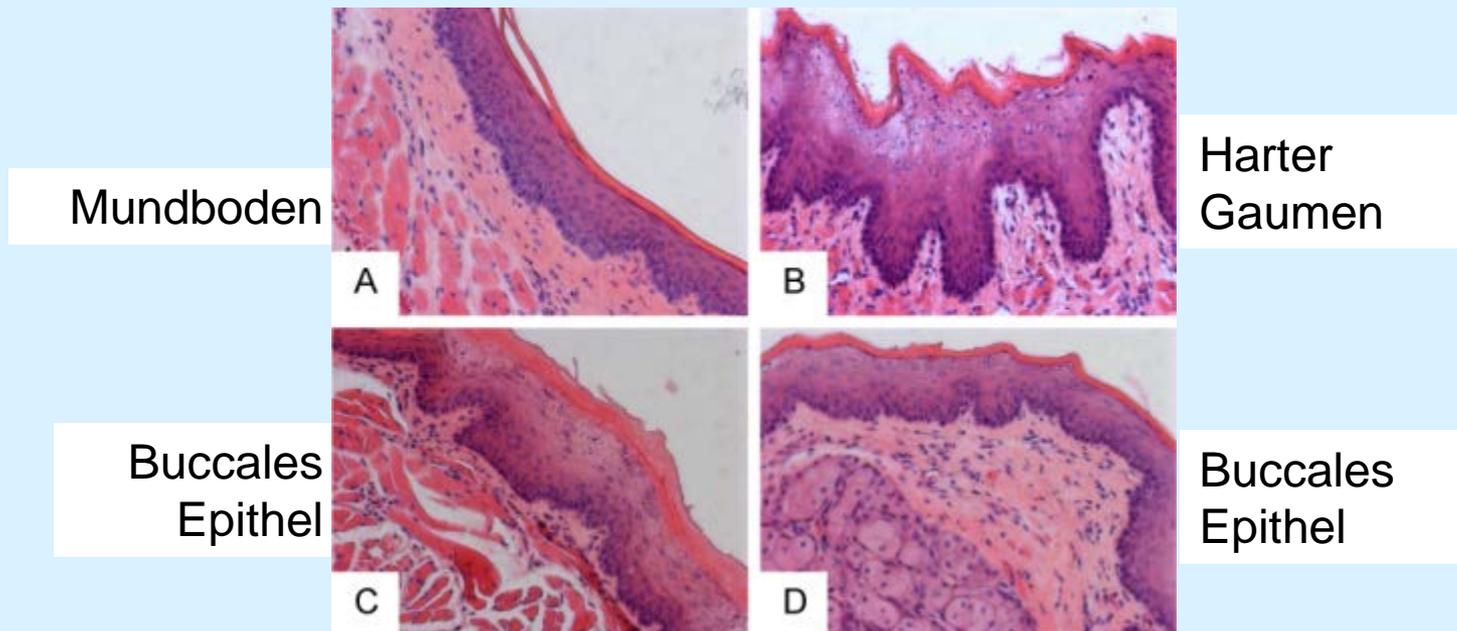
Tierexperimentelle Modelle der oralen Kandidose ?

***C. albicans* nicht Bestandteil der natürlichen mikrobiellen Flora von Mäusen**

▶ **Kolonisation/Infektion unter normalen Bedingungen kaum möglich**

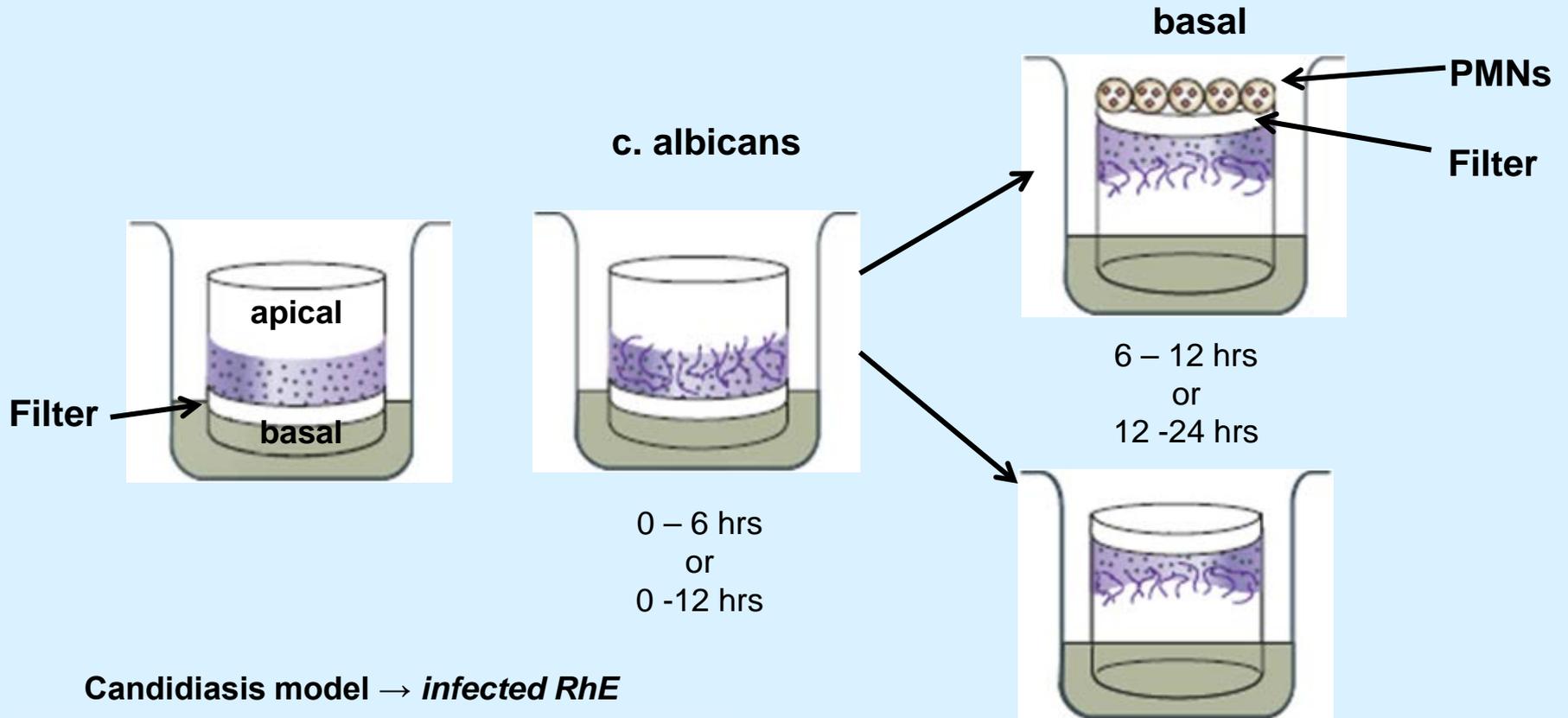
▶ **Deutlicher Unterschied in der Keratinisierung der Mundhöhle beim Menschen Schleimhaut – bei der Maus verhorntes Plattenepithel**

C57BL/6 Mäuse



Candidiasis – menschliches Epidermis Modell

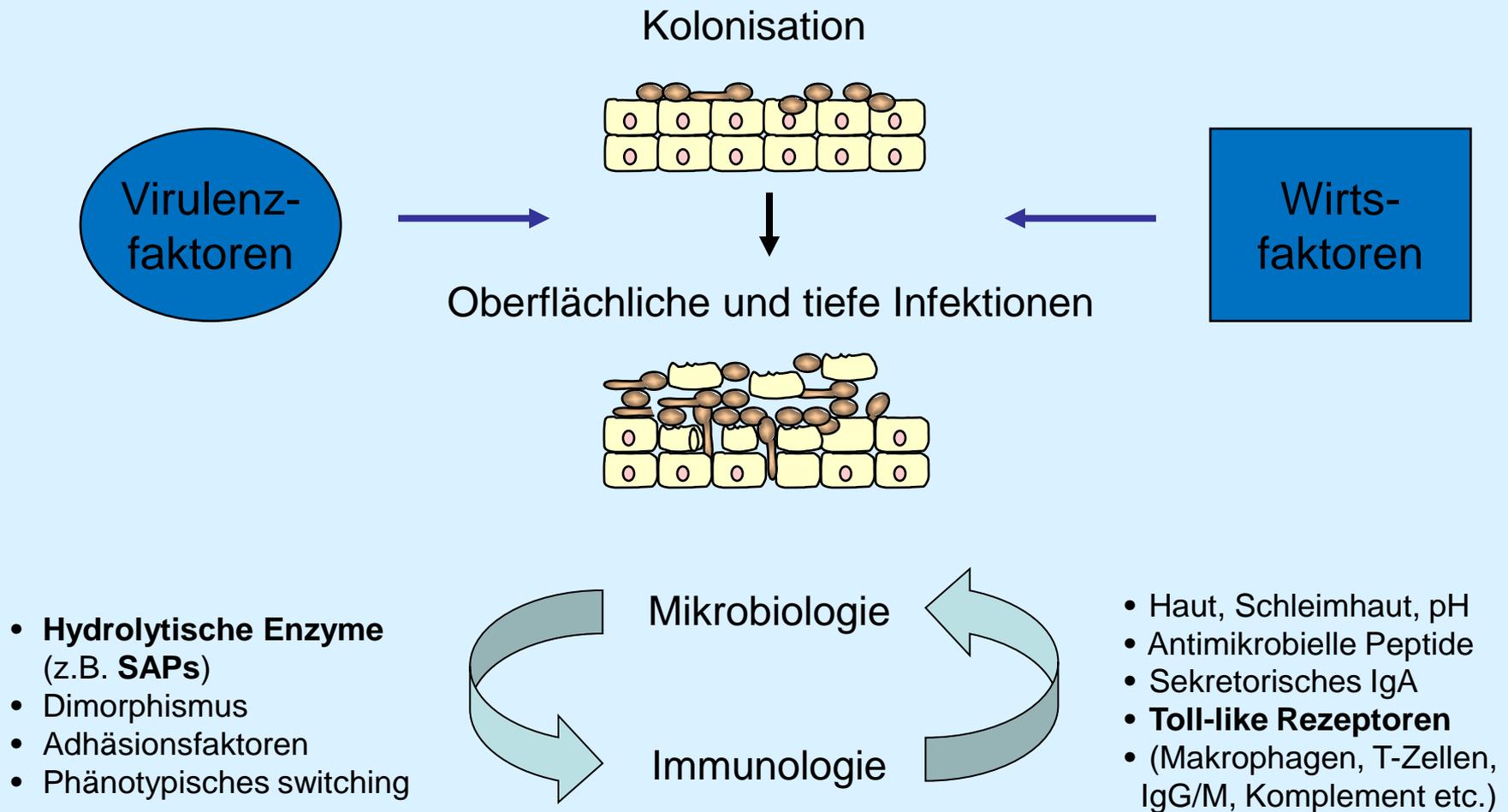
Günther Weindl, Inst. Pharmazie, FU Berlin



Candidiasis model → *infected RhE*

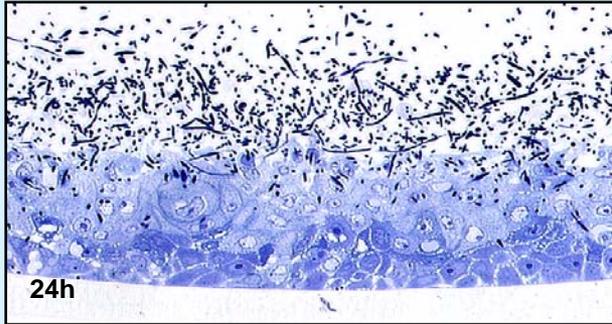


Lokalisierte Kandidosen (Weindl)



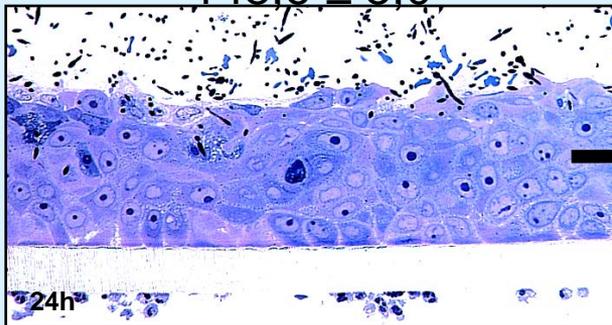
Anwesenheit von PMN: Hochregulation der epithelialen *TLR4* Genexpression

C. albicans

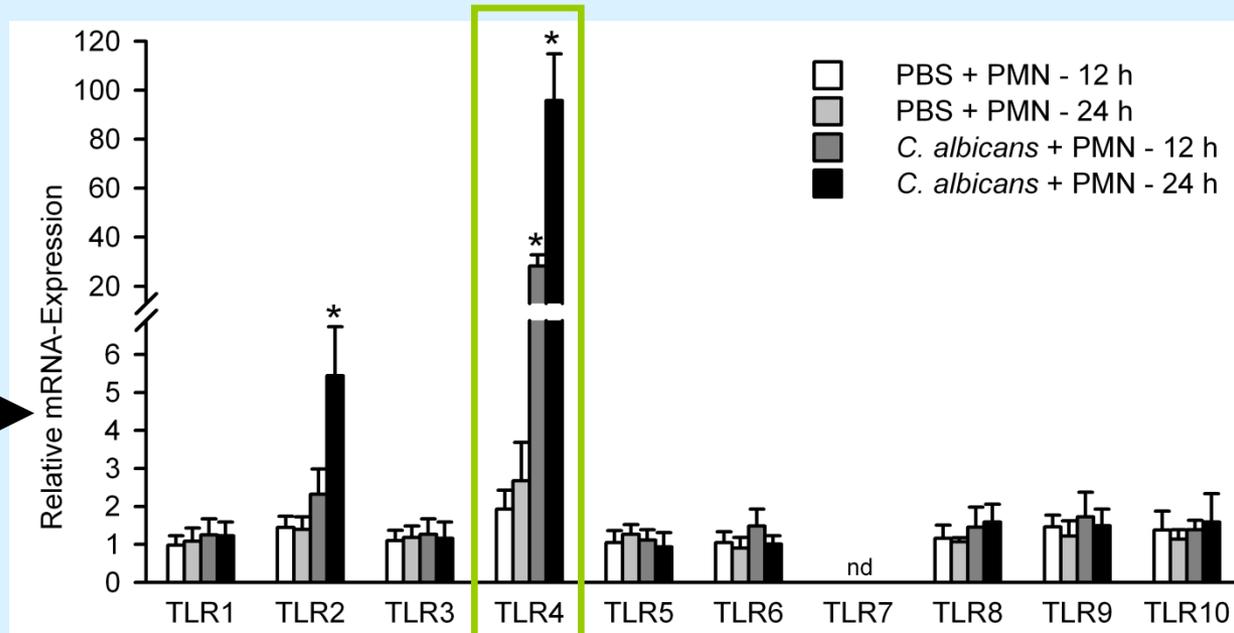


211,2 ± 6,6
LDH (U/l)

148,6 ± 5,0



C. albicans + PMN



n=6, *p < 0.05

Weindl *et al.* (2007) J Clin Invest

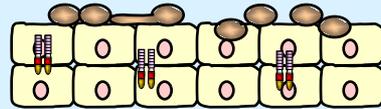
nd = nicht detektiert

Zusammenfassung – Kandidose Model I (Weindl)

C. albicans Kolonisation

Epithel

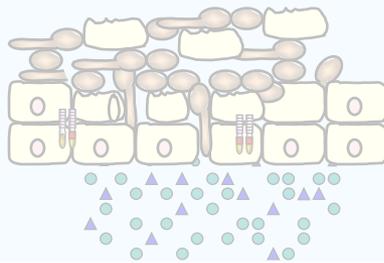
Keine Zytokinfreisetzung



C. albicans Infektion

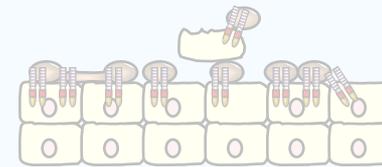
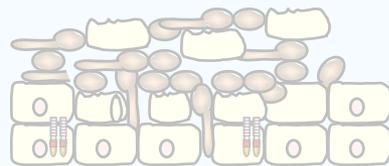
Epithel

Freisetzung von
IL-8, GM-CSF,...



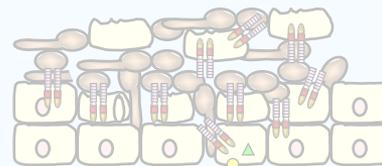
Chemotaxis von
PMN

PMN



Epithel

Protektion



Epithel

Hochregulation
von TLR4

Freisetzung von
IL-1 α , IL-1 β , IL-6,
TNF, IL-8, ...

PMN

Breakthrough Replicates Human Brain Cells for Use in Alzheimer's Research

By GINA KOLATA OCT. 12, 2014

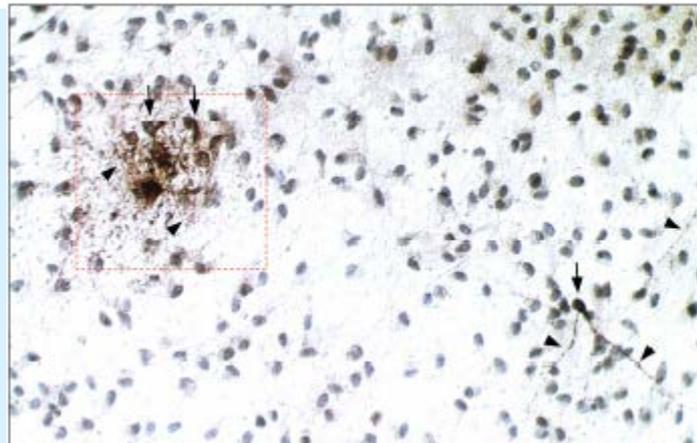
[doi:10.1038/nature13800](https://doi.org/10.1038/nature13800)

12 Oktober 2014

[doi:10.1038/nature13800](https://doi.org/10.1038/nature13800)

A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease

Se Hoon Choi^{1*}, Young Hye Kim^{1,2*}, Matthias Hebesch^{1,3}, Christopher Sliwinski¹, Seungkyu Lee⁴, Carla D'Avanzo¹, Hechao Chen¹, Basavaraj Hooli¹, Caroline Asselin¹, Julien Muffat⁵, Justin B. Klee¹, Can Zhang¹, Brian J. Wainger⁴, Michael Peitz³, Dora M. Kovacs¹, Clifford J. Woolf⁴, Steven L. Wagner⁶, Rudolph E. Tanzi¹ & Doo Yeon Kim¹





U.S. Department of Health and Human Services

NIH News

National Institutes of Health

Embargoed for Release
Tuesday, July 24, 2012

[National Center for Advancing Translational Sciences \(NCATS\)](#)

[National Institute of Neurological Disorders and Stroke \(NINDS\)](#)

[NIH Common Fund](#)

NIH funds development of tissue chips to help predict drug safety

DARPA and FDA to collaborate on groundbreaking therapeutic development initiative

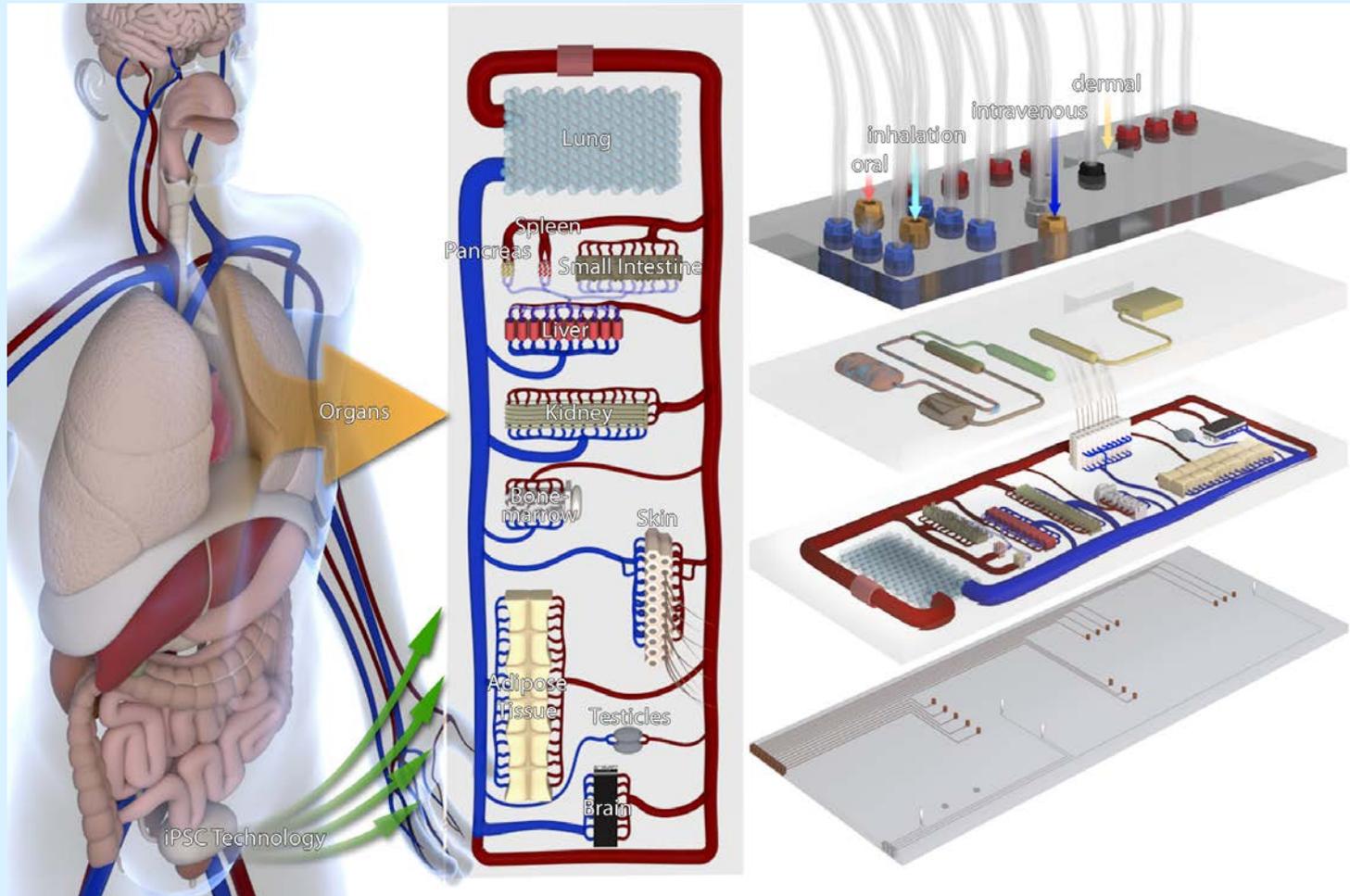
Seventeen National Institutes of Health grants are aimed at creating 3-D chips with living cells and tissues that accurately model the structure and function of human organs such as the lung, liver and heart. Once developed, these tissue chips will be tested with compounds known to be safe or toxic in humans to help identify the most reliable drug safety signals — ultimately advancing research to help predict the safety of potential drugs in a faster, more cost-effective way. The initiative marks the first interagency collaboration launched by the NIH's recently created National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS).

Tissue chips merge techniques from the computer industry with modern tissue engineering by combining miniature models of living organ tissues on a transparent microchip. Ranging in size from a quarter to a house key, the chips are lined with living cells and contain features designed to replicate the complex biological functions of specific organs.

[NIH's newly funded Tissue Chip for Drug Screening](#) initiative is the result of collaborations that focus the resources and ingenuity of the NIH, Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA) and U.S. Food and Drug Administration. NIH's Common Fund and National Institute of Neurological Disorders and Stroke led the trans-NIH efforts to [establish the program](#). The NIH plans to commit up to \$70 million over five years for the program.

"Serious adverse effects and toxicity are major obstacles in the drug development process," said Thomas R. Insel, M.D., NCATS acting director. "With innovative tools and methodologies, such as those developed by the tissue chip program, we may be able to accelerate the process by which we identify compounds likely to be safe in humans, saving time and money, and ultimately increasing the quality and number of therapies available for patients."

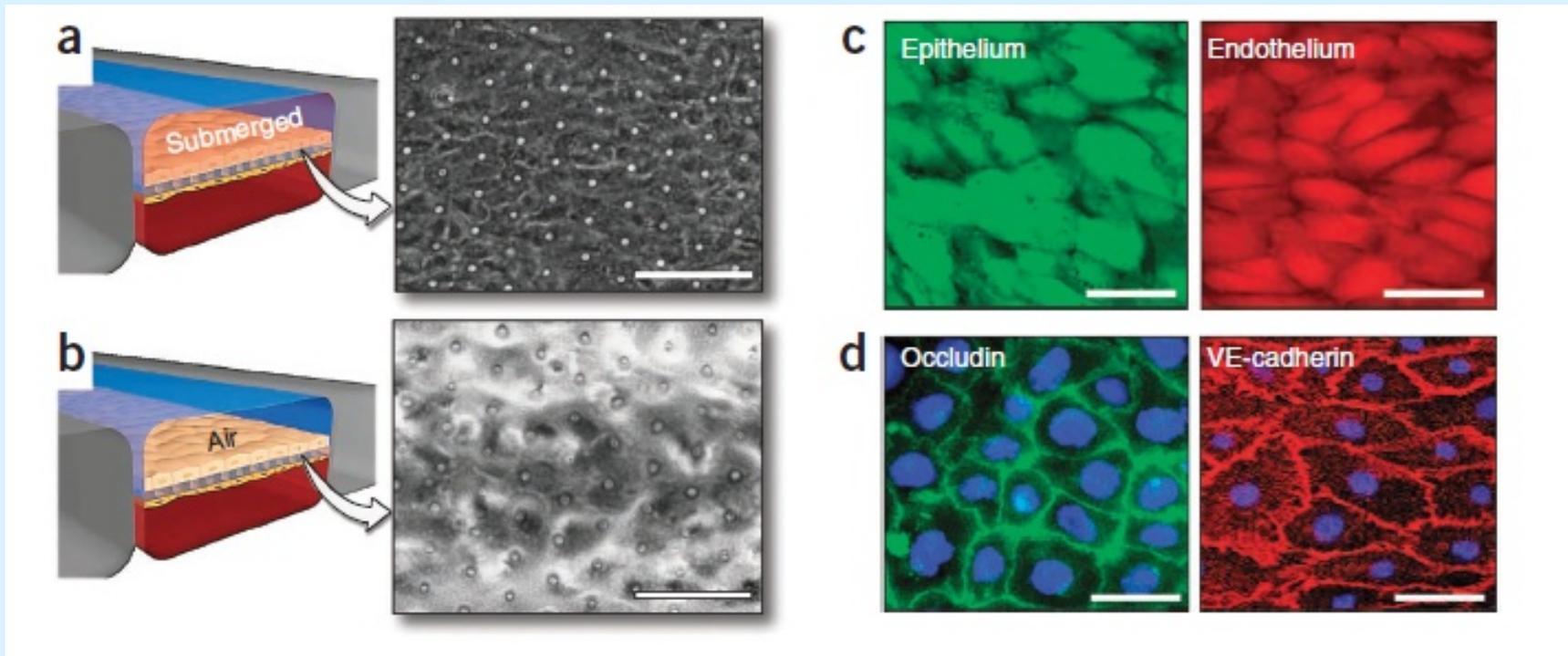
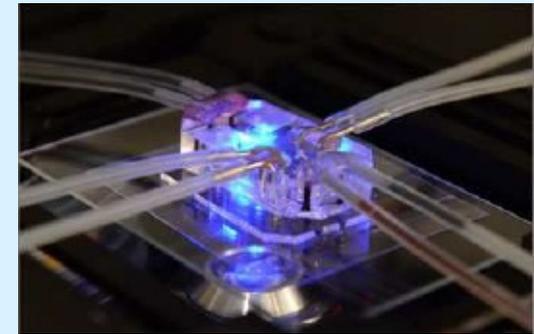
Partnering “Human-on-a-chip” disease models



- Transplantation model
- Autoimmune disease model

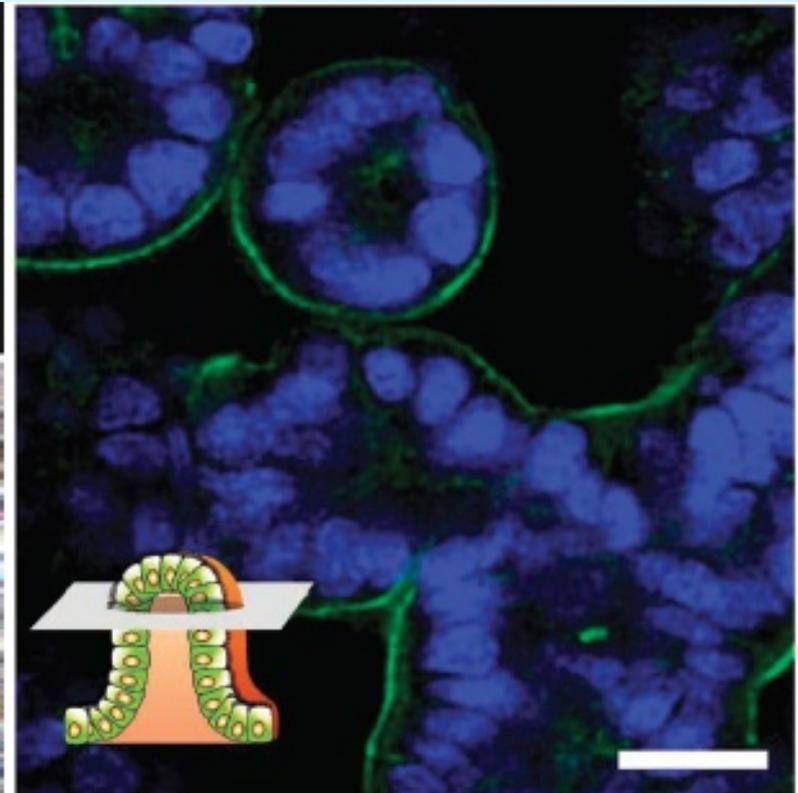
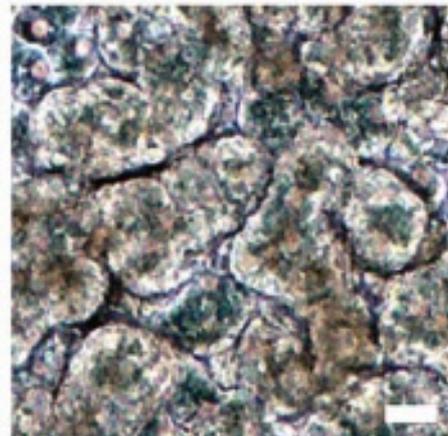
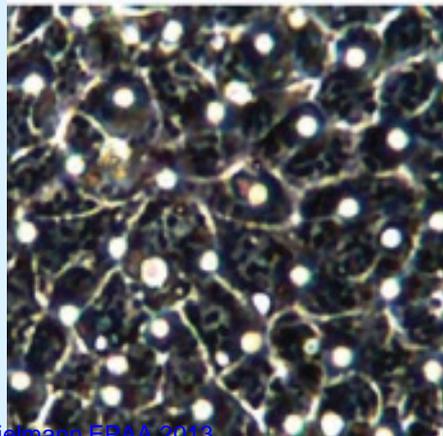
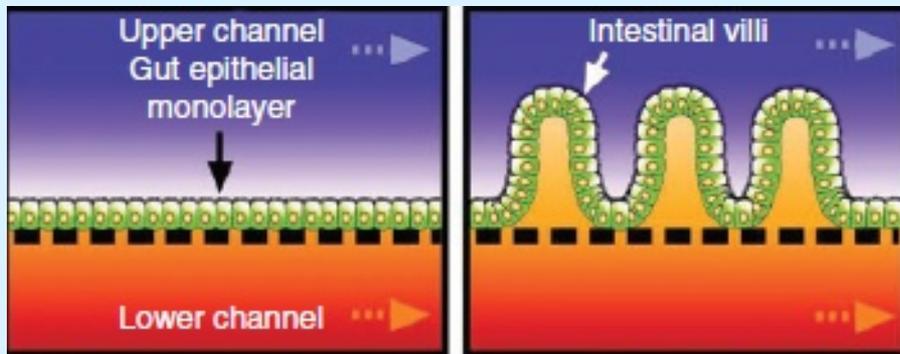
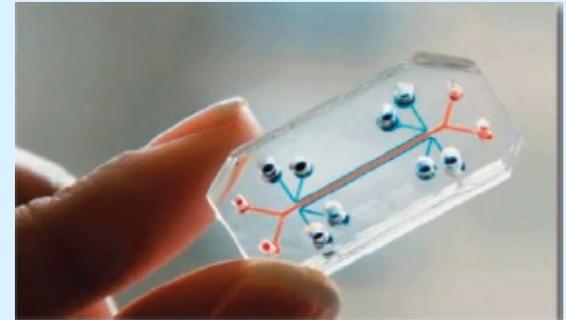
!?

Lung on a chip

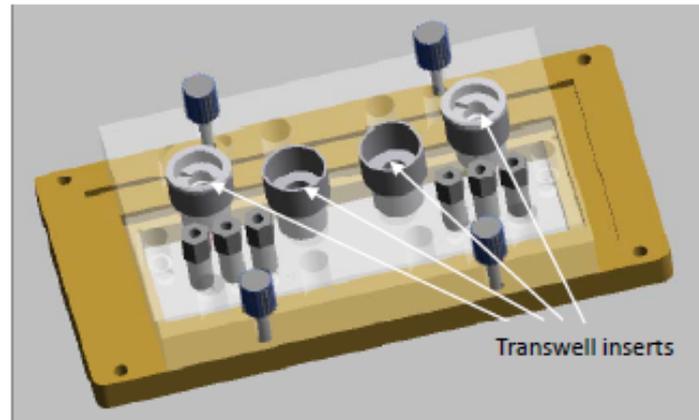


Microfabrication of human organs-on-chips
Donald E. Ingber et al. Wyss Institute/Harvard
| **VOL.8 NO.11 | 2013 | nature protocols**

Gut-on-a-chip

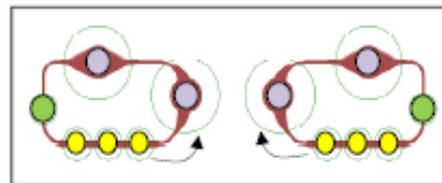


The Multi-Organ-Chip (MOC) technology



Laboratory bioreactor

- two peristaltic micro-pumps per chip
- two media perfusion circuits per chip
- adopted to use of Transwell-inserts
- two MOC's (4 circuits) per bioreactor

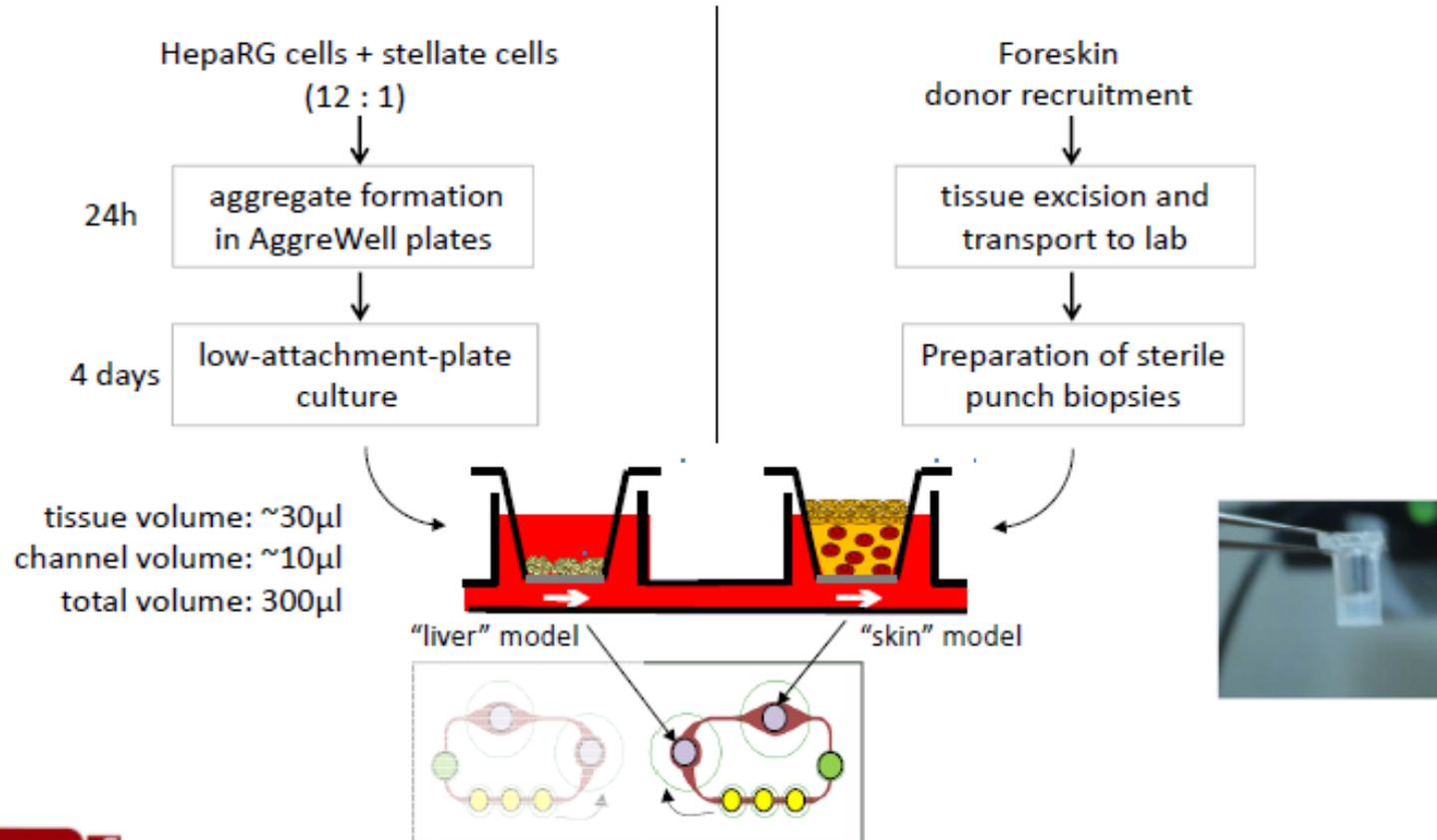


MOC's of microscopic slide-format

- - peristaltic micro-pump
- - Transwell inserts
- - injection port

28-day MOC culture – experimental setup

3D tissue preparation and chip loading



AXLR8 2012 Marx Walles

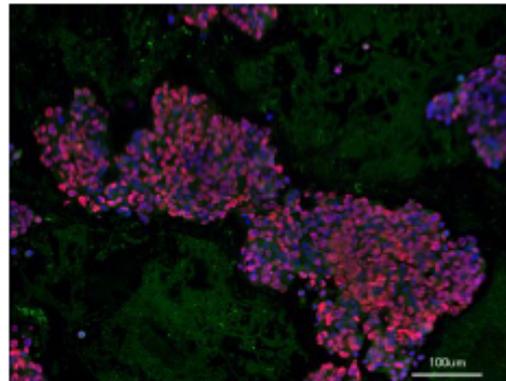


28-day MOC culture - preliminary results

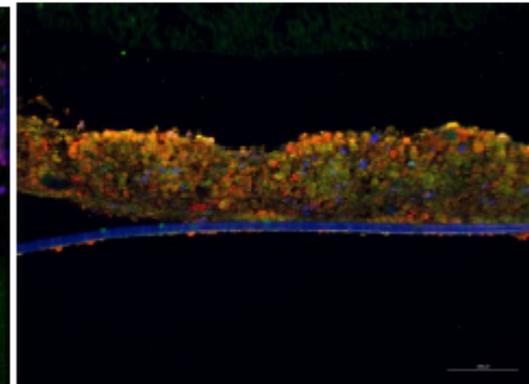
HepaRG-stellate cells 3D culture

IMMUNOHISTOSTAINING:
● - CYP3A4 ● - CYP7A1

day 0

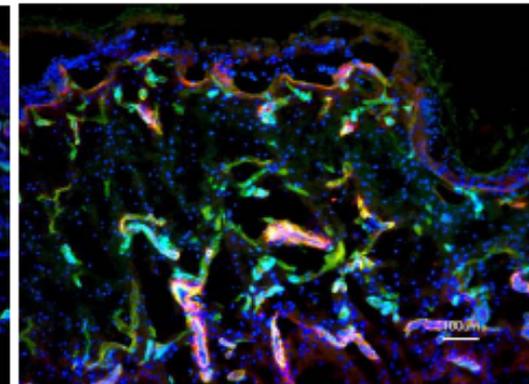
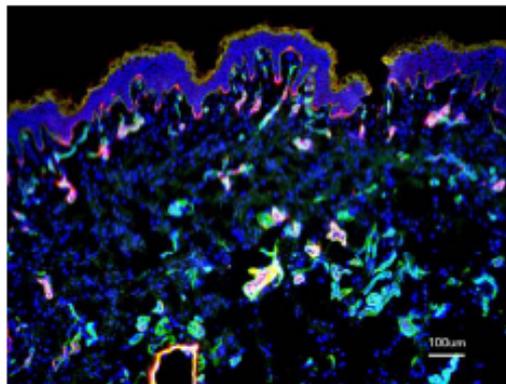


day 28



Foreskin 3D tissue biopsies

IMMUNOHISTOSTAINING:
● - Tenascin ● - Col IV



AXLR8 2012 Marx Walles



PRAGUE
Czech Republic

**9th World Congress
on Alternatives and Animal Use
in Life Sciences**

24 – 28 August 2014

www.wc9prague.org

“Human-on-a-chip” – Advancing regulatory science ...



Suzanne Fitzpatrick
US-FDA Center for Food
Safety & Applied Nutrition



Sonja Beken
FAHMP,
Chair of the
Expert Group
on 3R's at the
EMA



Sergey Tsyb
Deputy Minister of
industry and trade
(responsible for Pharma
2020 program)



Jufeng Wang
National Center
for Safety
Evaluation for
Drugs



Hajime Kojima
JaCVAM

“Human-on-a-chip Experts”

Andries van de Meer, Wyss Institute, Boston
Uwe Marx, Technische Universität, Berlin

Session I-3b: Regulatory science panel discussion .- “Human-on-a-chip”

Advancing regulatory science through innovation and worldwide networking for alternative testing





Regulatory science panel discussion Prague 28 August 2014

Statement of Intend

Taking into account the large scale projects ongoing on a global scale with regards to the human-on-a-chip technologies and the potential interest for global regulatory authorities of different sectors, it is considered important that **a systematic mechanism for exchange of information is being set up.**

The latter should take advantage of the collaborative initiatives already established for different sectors (e.g. EMA/FDA qualification exercises, ICH, ...). **Such a forum could also allow for cross sectorial discussions on qualification criteria and performance standards in order to foster possible qualification**



Berlin-Brandenburger Forschungsplattform BB3R mit integriertem Graduiertenkolleg

Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
Freie Universität Berlin