



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

Implementatie van 3V alternatieven voor ontwikkelingstoxiciteit in de regelgeving

RIVM Briefrapport 2014-0131
E.V.S. Hessel | P.T. Theunissen | A.H. Piersma



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

Implementatie van 3V alternatieven voor ontwikkelingstoxiciteit in de regelgeving

RIVM Briefrapport 2014-0131
E.V.S. Hessel | P.T. Theunissen | A.H. Piersma

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.

Ellen Hessel (GZB), RIVM
Peter Theunissen (GZB), RIVM
Aldert Piersma (GZB), RIVM

Contact:
Aldert Piersma
Gezondheidsbescherming (GZB)
aldert.piersma@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Economische Zaken, in het kader van Beleidsadvisering alternatieven voor Dierproeven

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven

www.rivm.nl

Publiekssamenvatting

Implementatie van 3V alternatieven voor ontwikkelingstoxiciteit in de regelgeving

Chemische stoffen en farmaceutische producten moeten wettelijk een strenge selectie doorstaan voordat zij op de markt mogen worden toegelaten. Bij de risicobeoordeling van stoffen voor schadelijke effecten op de vruchtbaarheid van de mens en de ontwikkeling van het ongeboren kind worden veel proefdieren gebruikt. Het RIVM heeft op twee manieren uitgezocht hoe de regelgeving zou kunnen worden aangepast, zodat er minder dierproeven nodig zijn, maar wel een nauwkeurige risicobeoordeling behouden blijft.

De eerste manier betreft een nieuwe testrichtlijn (de Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, EOGRTS) die de zogeheten twee-generatiestudie vervangt. Voorheen was het verplicht om bij twee generaties van dieren te toetsten of een stof een schadelijk effect heeft. In de voorgestelde testrichtlijn wordt bij één generatie uitgebreider en nauwkeuriger gemeten, zodat de tweede niet meer nodig is. Door met de EOGRTS te werken, neemt het proefdiergebruik met 40 procent af, én worden betrouwbaardere resultaten verkregen. Deze test is inmiddels wettelijk geïmplementeerd.

Bij de tweede manier is in kaart gebracht of eventuele schadelijke effecten voor het embryo van nieuw te ontwikkelen geneesmiddelen in één in plaats van twee diersoorten (rat en konijn) kunnen worden getest. Hierdoor zou het benodigde aantal dierproeven voor dit onderdeel van de risicobeoordeling tot 50 procent kunnen verminderen. Voorlopige analyses wijzen erop dat de testresultaten in beide diersoorten niet veel verschillen. Het is echter nog te vroeg om uit te spreken welke van de twee diersoorten het beste kan worden ingezet. Ook kan niet uitgesloten worden dat het soms noodzakelijk blijft om in beide diersoorten te testen. Het RIVM gaat deze analyse in 2015 verder uitwerken.

In de jaren zeventig van de vorige eeuw is het 3V-principe (Verminderen, Verfijnen of Vervangen) in de Wet op de dierproeven geïmplementeerd. Met dit onderzoek draagt het RIVM eraan bij dat dit 3V- principe in de internationale wetgeving wordt geaccepteerd en doorgevoerd.

Kernwoorden:

3V-principe, Ontwikkelingstoxiciteit, reproductietoxiciteit, risicobeoordeling, EOGRTS (the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study), twee-generatiestudie, twee diersoorten beleid, chemische stoffen, farmaceutische producten, internationale regelgeving.

Abstract

The registration and marketing of chemicals and pharmaceuticals is strictly regulated by international legislation. Reproductive toxicity risk assessment for man is based on animal studies, for which high numbers of experimental animals are needed. RIVM analyzed two procedures of how existing reproduction toxicity testing guidelines might be adapted to reduce experimental animal numbers without affecting the reliability of the results.

Firstly, a new testing guideline (the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, EOGRTS) was evaluated as a possible replacement for the 2-generation toxicity study. The 2-generation toxicity study requires two generations of animals to determine reproduction toxicity. For the new EOGRT guideline only one generation suffices. The replacement of the 2-generation study by the EOGRTS thereby results in a reduction of animal use for forty percent. Additionally, experiments performed for the EOGRTS results in a more extensive and detailed dataset in comparison to the 2-generation study, increasing reliability of the study results. This test is already implemented in international legislation.

Secondly, existing guidelines describe that for developmental toxicity assessment, pharmaceuticals need to be tested in two species. In this study, the possibility to restrict testing to only one species was investigated and if so in what cases. This may result in a reduction of ca 50 percent of animals for the risk assessment of developmental toxicity. Preliminary data suggest that the results are not meaningfully different between the two species, however as yet no recommendation can be done about which species should be preferred. Furthermore, it cannot be excluded that under specific circumstances both species may still be needed. In 2015 more detailed analysis will be performed to answer these questions.

In the seventies, the 3R-principle (Replacement, Reduction and Refinement) for alternatives of animal experiments were implemented in the Dutch Experiments on Animals Act. This research line within the RIVM contributes to the acceptance and implementation of the 3R-principle within international legislation.

Keywords:

3R-principle, developmental toxicity, reproductive toxicity, risk assessment, EOGRTS (the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study), 2-generation toxicity study, two species guideline, pharmaceuticals, chemicals, international legislation.

Inhoudsopgave

Samenvatting – 9

1 Introductie – 11

2 Extended One Generation Reproductive Toxicity test (EOGRT) in de EU. – 13

2.1 EOGRT – 13

2.2 EOGRT in de huidige regelgeving – 13

2.3 Toekomstplannen / aanbevelingen van de EOGRT – 14

3 Het nut van twee diersoorten (konijn en rat) bij het vaststellen van ontwikkelingstoxiciteit. – 15

3.1 Historie van het testen van twee diersoorten – 15

3.2 Onderzoeksvraag / doel – 16

3.3 Internationaal samenwerkingsverband – 16

3.4 Database – 16

3.5 Resultaten – 17

3.6 Conclusies – 17

3.7 Effect op de regelgeving – 18

3.8 Toekomstplannen / aanbevelingen met betrekking tot database – 18

4 Referenties – 21

Samenvatting

Het RIVM richt zich op het werken aan de acceptatie en implementatie van 3V alternatieve testen in de wettelijke kaders om zo het proefdiergebruik binnen de internationale wetgeving te reduceren. Hiervoor is een gezamenlijke aanpak van alle betrokken partijen van belang om precies in kaart te brengen waar er mogelijkheden zijn voor afname van het aantal proefdieren binnen de regelgeving. Het betreft hier overheden, internationale regelgevende instanties en industrie. In dit briefrapport is met betrekking tot de acceptatie en implementatie van 3V alternatieve testen in de wettelijke kaders het toepassingsdomein ontwikkelings- en reproductietoxicologie beschreven met de volgende onderwerpen: 1) Het bevorderen van de acceptatie en implementatie van de Extended One Generation Reproductive Toxicity test (EOGRT) in de EU en 2) Het identificeren van het nut van het gebruik twee diersoorten bij het vaststellen van ontwikkelingstoxiciteit en de mogelijke toegevoegde waarde van de muis embryonale stamceltest.

De EOGRTS is in 2014 opgenomen in het testrichtlijnenprogramma van de EU en kan als vervanger dienen van de tot nu toe verplichte 2-generatie reproductiestudie. Het gebruik van de EOGRTS leidt tot een substantiële afname van het aantal proefdieren per geteste stof. Daarnaast wordt elk dier in meer detail onderzocht, waardoor de gevoeligheid van de test als geheel kan toenemen. Er komen ook steeds meer voorstellen vanuit de industrie tot toepassing van de EOGRTS. Het lijkt een kwestie van tijd en toenemende ervaring die ertoe zal leiden dat de EOGRTS meer gebruikt zal worden en langzamerhand een verhoogde acceptatie zal krijgen. Eind juni 2014 is de EOGRTS door ECHA opgenomen als test in het REACH programma.

Het uiteindelijke doel van de 'twee diersoorten' studie is om vast te stellen of het noodzakelijk is farmaceutische stoffen in twee diersoorten te testen op de embryo-foetale ontwikkeling of dat met één diersoort kan worden volstaan en onder welke voorwaarden. Hiervoor is een database opgesteld met beschikbare data van de twee diersoorten van farmaceutische stoffen. Met de data is een retrospectieve analyse gedaan. De belangrijkste conclusie is dat er vooralsnog geen duidelijke voorkeur is om een van de twee diersoorten als primair aan te merken en dat in de meeste gevallen geen verschillen worden gevonden tussen de twee diersoorten. Deze activiteiten zullen naar verwachting leiden tot een beter geïnformeerde toepassing van dierstudies voor ontwikkelingstoxiciteit, vastgelegd in internationale regelgeving, waarbij in veel gevallen de tweede diersoorten, die nu nog verplicht wordt gesteld, overbodig wordt. Dit kan leiden tot een forse vermindering van proefdieren.

1 Introductie

Om gericht te werken aan de acceptatie en implementatie van 3V alternatieve testen in de wettelijke kaders is een gezamenlijke aanpak van alle betrokken partijen van belang. Het betreft hier overheden, internationale regelgevende instanties en industrie. Deze aanpak houdt in dat in elke fase van de keten van onderzoek tot wettelijke implementatie van 3V-alternatieven alle ketenpartners worden betrokken. Het plan van aanpak voor deze stapsgewijze benadering staat beschreven in het in 2012 verschenen RIVM briefrapport *'Knelpunten in de keten van validatie, acceptatie en implementatie op het gebied van ontwikkelings- en reproductietoxiciteit'* (Vandebriel et al., 2012). Er is gekozen om te werken aan één toepassingsdomein om op een gerichte manier het functioneren van deze keten te optimaliseren, drempels te identificeren, acties te benoemen om deze drempels te verlagen en wettelijke implementatie te bevorderen. In 2013 en 2014 is er gewerkt binnen het toepassingsdomein ontwikkelings- en reproductietoxicologie aan de volgende onderwerpen: 1. Het bevorderen van de acceptatie en implementatie van de Extended One Generation Reproductive Toxicity test (EOGRT) in de EU (hoofdstuk 2) en 2. Het identificeren van het nut van het gebruik twee diersoorten bij het vaststellen van ontwikkelingstoxiciteit met het oog op mogelijke reductie van proefdiergebruik (Hoofdstuk 3).

2 Extended One Generation Reproductive Toxicity test (EOGRT) in de EU.

2.1 EOGRT

Sinds 1983 wordt de OECD 416 testrichtlijn (2-generatie reproductiestudie) toegepast als test methode om reproductietoxiciteit van chemische stoffen te testen. Thans wordt deze studie voorgeschreven voor hoog tonnage chemische stoffen onder REACH (Registratie, Evaluatie, Autorisatie en restrictie van Chemische stoffen). De kritiek op deze test methode is dat er een groot aantal dieren wordt gebruikt en dat er per dier relatief weinig details worden onderzocht. Om die reden is er in 2000 vanuit ILSI-HESI een comité gestart (ACSA Agricultural Chemical Safety Assessment) om de regelgeving te evalueren. Zij hebben in 2006 een voorstel gedaan voor een nieuwe onderzoeksopzet; the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study (EOGRTS; (Cooper et al., 2006).

De essentie van EOGRTS vergeleken met de OECD TG 416 richtlijn is als volgt:

- De blootstellingsperiode in de mannelijke dieren voorafgaand aan de paring wordt verkort van 10 weken naar 2 weken.
- Het aantal ontwikkelingsparameters voor geslachtsorganen worden vergroot.
- Drie pups per geslacht zullen worden geselecteerd om, zo nodig, een F2 generatie te produceren.
- Extra beoordeling van neuronale ontwikkelingstoxiciteit (in de richtlijn beschreven als cohort 2)
- Extra beoordeling van immuunsysteem gerelateerde ontwikkelings-toxiciteit (in de richtlijn beschreven als cohort 3)
- Extra beoordeling van schildklierhormoon niveaus
- F2 generatie is niet verplicht (de 2de generatie nakomelingen van het ouderpaar dat is ingezet voor de fok).

In de EOGRTS worden in totaal voor het testen van één chemische stof minder dieren gebruikt (totaal ca. 1400 vergeleken met ca. 2600 voor de OECD-416, beperking van ca. 40%). Eerdere retrospectieve studies van het RIVM hebben laten zien dat effecten bij de tweede generatie nakomelingen, die verplicht onderzocht worden in de OECD TG 416, geen toegevoegde waarde hebben voor het vaststellen van de laagste effectieve dosis van een stof (Piersma et al., 2011). Deze dosis is bepalend in de risicoschatting van de reproductietoxicologie. Op basis daarvan is de EOGRTS, waarin het testen van de tweede generatie nakomelingen niet verplicht is, voorgesteld als vervangende studie, met een veel lager proefdiergebruik zoals hierboven aangegeven. In de EOGRTS wordt per dier ook in meer detail onderzoek verricht op het gebied van endocrinologie, immunologie en neurologie (zoals hierboven beschreven). De EOGRTS is gevoeliger dan de OECD TG 416 door een toename in het aantal gemeten parameters en door een groter aantal F1 dieren (eerste generatie nakomelingen van het ouderpaar dat wordt ingezet voor de fok).

2.2 EOGRT in de huidige regelgeving

De EOGRTS, in 2011 als testrichtlijn OECD 443 geaccordeerd door de OECD, is recent opgenomen in het testrichtlijnenprogramma van de EU en wordt eind 2014 hoogstwaarschijnlijk opgenomen in de testvereisten onder REACH als de vervanger voor de 2-generatie reproductiestudie. Voor deze laatste stap is nog discussie gaande binnen ECHA (European Chemicals Agency) over de noodzaak om in uitzonderlijke situaties af te wijken van het EOGRTS protocol en toch een tweede generatie te vragen. Met name ECHA neemt het conservatieve standpunt in dat een tweede generatie mogelijk toch specifieke bevindingen zal leiden,

terwijl de internationale retrospectieve studie, die in de wetenschappelijke wereld vrijwel algemeen gesteund wordt, laat zien dat dit uiterst onwaarschijnlijk is. Daarnaast loopt er nog een discussie over de vraag in hoeverre de cohorten 2 en 3 voor neurotoxiciteit en immuuntoxiciteit als verplichte onderdelen moeten worden aangemerkt. Dit ligt gevoelig, aangezien de cohorten vanuit wetenschappelijk perspectief integraal onderdeel zijn van de EOGRTS en mogelijk belangrijke additionele informatie opleveren. Daar staat tegenover dat politiek gezien de invoering van de test spoediger zal plaatsvinden zonder de cohorten te verplichten, aangezien deze tot extra kosten zullen leiden. Waarschijnlijk zal dit laatste pad gevolgd worden, met de gedachte dat in de toekomst het onderwerp van de cohorten opnieuw ter tafel gebracht zal worden.

Intussen wordt ook door de industrie steeds meer voorstellen tot toepassing van de EOGRTS gedaan. Het lijkt een kwestie van tijd en ervaring die ertoe zal leiden dat de EOGRTS meer gebruikt zal worden en langzamerhand een verhoogde acceptatie zal krijgen. In wetenschappelijke literatuur wordt de EOGRTS ook regelmatig genoemd als een nuttige alternatieve dierstudie met een betere detectie van effecten op hormoonsystemen, immuunsysteem en neuraal systeem.

2.3 Toekomstplannen / aanbevelingen van de EOGRT

In 2014 en 2015 zullen de ontwikkelingen rond de implementatie en toepassing van de EOGRTS binnen REACH worden gestimuleerd mede door deel te nemen aan internationale gremia, congressen en symposia. De besluitvorming over de invoering van cohorten 2 (neurotoxiciteit) en 3 (immuuntoxiciteit) van de EOGRTS bij ECHA worden op de voet gevolgd. Het RIVM is voorstander van het integraal uitvoeren van de EOGRTS, dus inclusief deze cohorten. Een recente studie, door het RIVM uitgevoerd heeft laten zien dat immuunparameters bij pre- en vroeg-postnatale blootstelling relatief gevoelig zijn ten opzichte van de klassieke ontwikkelingsparameters (Hessel et al., in press). Deze analyse zal gebruikt worden om in internationaal verband de noodzaak van het testen van immuuntoxiciteit in ontwikkelingsstudies zoals de EOGRTS onder de aandacht te brengen.

3 Het nut van twee diersoorten (konijn en rat) bij het vaststellen van ontwikkelingstoxiciteit.

3.1 Historie van het testen van twee diersoorten

Al gedurende meer dan 30 jaar worden volgens de huidige risicobeoordelingsrichtlijnen rat én konijn studies uitgevoerd om ontwikkelingstoxiciteit te bepalen in de regulatoire kaders van industriële chemische stoffen, pesticiden en geneesmiddelen (Theunissen et al., 2014). De standaard en verplichting vanuit de regelgeving voor geneesmiddelen is één knaagdier soort (rat) én één niet-knaagdier soort (konijn) te testen (ICH, 2005). De reden van dit 'twee diersoorten' beleid komt door de thalidomide tragedie in de jaren 60. Kinderen van moeders die tijdens de vroege zwangerschap waren blootgesteld aan thalidomide (softenon, een slaapmiddel) werden geboren met verkorte ledematen. Verkorte ledematen werden wel gevonden in blootstellingsstudies met konijnen, maar niet in ratten (Schardein, 2000; Shepard, 1998). Daardoor werd er geconcludeerd dat het konijn soms een betere voorspellende waarde kon geven voor ontwikkelingstoxiciteit in mensen dan de rat. Uiteindelijk bleek dat bij dezelfde doseringen waarbij het konijn ledematenproblemen liet zien, thalidomide in de rat foetale sterfte veroorzaakte (Janer et al., 2008). Wanneer zoals gebruikelijk aangeboren afwijkingen even zwaar worden gerekend als foetale sterfte zouden dus met de huidige regelgeving voor thalidomide de bevindingen in zowel ratten als konijnen tot dezelfde risicoschatting leiden voor mensen.

Deze conclusie roept de vraag op of het echt noodzakelijk is om twee diersoorten te testen in de huidige risicobeoordeling van de ontwikkelingstoxicologie. Als alternatieve strategie kan worden gedacht aan de mogelijkheid dat één diersoort als eerste wordt getest. Afhankelijk van de resultaten in de eerste diersoort kan in geval de uitkomst niet geheel helder is de andere diersoort alsnog worden getest (Hurtt et al., 2003).

Om te onderzoeken of het testen van één diersoort voor ontwikkelingstoxiciteit voldoende is, is er een database gebouwd en geanalyseerd waarin de resultaten van ontwikkelingstoxiciteitstesten bij ratten en konijnen retrospectief werden vergeleken. Een dergelijke analyse is al eerder uitgevoerd voor industriële chemische stoffen en pesticiden (Hurtt et al., 2003; Janer et al., 2008; Knudsen et al., 2009; Rorije et al., 2012). Deze vergelijking liet zien dat voor de meeste chemische stoffen het testen van een tweede diersoort geen toegevoegde waarde had. De laagste schadelijke dosis verschilde tussen de twee diersoorten in de meeste gevallen minder dan een factor 10 en die marge kan verklaard worden door biologische variatie (Theunissen et al., 2014). Aan de andere kant, een klein, maar een beduidend aantal studies liet zien dat voor sommige stoffen één diersoort geen schadelijk ontwikkelingseffect liet zien, maar de andere diersoort wel. Thans wordt onderzocht of dit toegeschreven moet worden aan studie opzet, verschillen in metabole capaciteit tussen species of het optreden van ernstige effecten bij moederdieren in één species. Verder is er gevonden dat de rol van maternale toxiciteit als mogelijke oorzaak van foetale schade moeilijk is te bepalen en dat de beoordeling van een expert essentieel is voor de juiste conclusie. Voor farmaceutische stoffen is deze vergelijking nog niet gemaakt en dit kan verder inzicht geven in het belang van het testen van twee diersoorten.

3.2 Onderzoeksvraag / doel

Het uiteindelijke doel van de onderliggende studie is om vast te stellen of het noodzakelijk is farmaceutische stoffen in twee diersoorten te testen voor de effecten op de embryo-foetale ontwikkeling of dat met één diersoort kan worden volstaan en onder welke voorwaarden. Beperking tot één diersoort kan namelijk tot een aanzienlijke vermindering van proefdiergebruik leiden. De analyse wordt gedaan door een database te genereren die gegevens van circa 400 farmaceutische stoffen waarvoor zowel in rat als konijn ontwikkelingstoxiciteit studies zijn uitgevoerd (Theunissen et al., 2014). Er wordt een retrospectieve analyse uitgevoerd met deze gegevens om antwoord op bovenstaande vraag te krijgen.

3.3 Internationaal samenwerkingsverband

De database wordt gevuld met gegevens uit bestaande dierstudies met farmaceutische stoffen in ratten en konijnen. De studies zijn verkregen via het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG), de European Medicine Agency (EMA), de Amerikaanse Federal Drug Agency (US-FDA) en het International Life Science Institute (ILSI) - Health and Environmental Sciences Institute (ILSI-HESI) (Theunissen et al., 2014). Overheden, internationale regelgevende instanties en industrie werken samen om bestaande gegevens te verzamelen in een database voor analyse en een consensus te bereiken voor een optimale teststrategie. Dit project is in samenwerking met de verschillende stakeholders samengebracht in overkoepelende projecten: SLIM (Synergy in Life Science, Innovation and Marketing) en 'international life science institute (ILSI) - Developmental and Reproductive Toxicology (ILSI-DART). De betrokken stakeholders zijn: Belgium FAGG, CBG-MEB, EMA, ILSI-HESI, RIVM, US-FDA, US-EPA; AbbVie, AstraZeneca, BMS, Celgene, Charles River, Covance, Dow Chemical, Eli Lilly, Exxon Mobile, GSK, J&J, Merck, Pfizer, Roche, Sanofi, Takeda. In verschillende internationale gremia en bij congressen zijn data van dit project gepresenteerd en bediscussieerd. Verder is er maandelijks een teleconferentie en tweemaal per jaar een face-to-face meeting in het DART comité.

3.4 Database

Gegevens

De farmaceutische stoffen zijn geanonimiseerd wat betreft naam, herkomst en structuurformule. Van elk product worden de details over onderzoekopzet, dosering, blootstellingsduur, blootstellingsroute, diersoort, stam en de gevonden effecten beschreven. Verder worden gegevens over de kinetiek als die beschikbaar zijn verzameld (dit om een duidelijk beeld te krijgen over de systemische blootstelling of functionele effecten) en humane gegevens over interne blootstelling worden aan de database toegevoegd. Voor elk farmaceutisch product zijn de beschikbare maternale en foetale LOAEL (Lowest-observed-adverse-effect level) verzameld.

Analyse

Data worden als volgt geanalyseerd:

1. Vergelijken van Rat en Konijn studies:
 - 1) vergelijken van foetale LOAEL (gebaseerd op maternale blootstelling).
 - 2) Vergelijken van de LOAEL verkregen via systemische blootstelling van de pup indien kinetiek data aanwezig zijn voor beide diersoorten).
 - 3) Vergelijken van maternale LOAELs

- 4) Verder wordt er gekeken naar het type effect, de grootte van het effect en de ernst van de nadelige gevolgen bij een specifieke LOAEL. Zo kan er worden bepaald of een diersoort misschien informatiever is dan de andere.
- 5) Werkingsmechanisme van het effect wordt zo mogelijk achterhaald uit aangeleverde gegevens

Bij verschillen tussen de laagste effectieve dosis in de twee diersoorten met een factor kleiner dan 10 wordt het dossier van de betreffende stof niet verder uitgezocht, omdat dit een factor is die representatief is voor de biologische variatie. Deze factor is eerder bepaald in een vergelijkbare studie uitgevoerd door het RIVM aan industriële chemische stoffen en pesticiden (Piersma et al., 2011).

Als er verschillen worden gevonden (laagste effectieve dosis (lowest observed effect level LOEL) verschil > 10), dan wordt de oorzaak van de onderlinge verschillen in meer detail onderzocht om de verschillen in toxicologisch respons te verklaren. Dit betekent dat er wordt gekeken of bijvoorbeeld stam- of werkingsmechanisme het verschil kunnen verklaren. Dit levert meer inzicht in verschillen en het type respons tussen rat en konijn.

3.5 Resultaten

Algemene voorlopige resultaten:

- Voor 283 van de ruim 400 stoffen werden toxicokinetische gegevens beschikbaar gesteld. Toxicokinetische parameters laten niet veel verschil zien tussen de twee diersoorten.
- De meeste farmaceutische producten laten systemische LOAELs zien met een factor < 10 tussen rat en konijn (n=224/283, 80%), wat binnen de te verwachten biologische variatie valt.
 - Het konijn laat meer uitschieters zien (n= 38 vs 10 respectievelijk) waarbij de factor 10 overschreden wordt. Dit lijkt onafhankelijk te zijn van het type werkingsmechanisme, en kan een gevolg zijn van toeval of van specifieke oorzaken waarnaar nog onderzoek plaats vindt.
 - Maternale versus foetale toxiciteit, werkingsmechanisme, type effect (malformatie, groeivertraging, dood) en stam leveren geen algemene verklaring voor situaties waarin rat en konijn verschillen.
- Er is geen algemeen patroon of verschil te zien met betrekking tot de ernst van de effecten tussen rat en konijn. Beide species lijken over het algemeen even gevoelig, hoewel de aard van het foetale effect kan verschillen.
- In het algemeen lijken bij de rat vaker structurele misvormingen voor te komen, terwijl bij het konijn iets vaker foetale sterfte gezien wordt.

Resultaten met betrekking tot het type reacties

- De rat heeft vaker al malformaties bij de laagste dosering die een effect vertoont (LOAEL) terwijl dit bij het konijn vaak pas bij een hogere dosering gezien wordt.
- Er is weinig overlap tussen rat en konijn wat betreft malformaties in specifieke organen.

3.6 Conclusies

De analyse wijst tot dusverre niet op een duidelijke voorkeur voor een van de twee diersoorten. Gezien deze uitkomst zullen onderzoekers zelf meestal wel de voorkeur geven aan de rat als eerste species, vanwege lagere kosten en omdat bij de rat iets vaker aangeboren afwijkingen gezien worden, waardoor de rat in dat opzicht als iets gevoeliger aangemerkt zou kunnen worden. Er zijn niet

directe factoren aan te wijzen die, in specifieke gevallen, het verschil in respons kunnen verklaren. Mogelijk kunnen verdere analyses leiden tot een beslisboom waarmee bepaald wordt welk diersoort het best als eerste getest kan worden voor ontwikkelingstoxiciteitstest en op basis van welke uitkomsten het testen in een tweede diersoort nog nodig is.

Mocht deze verdere analyse niet tot eenduidige resultaten leiden, dan zou een andere optie zijn om de tweede diersoort niet al in de preklinische fase te testen maar pas tijdens fase III (human trials). In de tussentijd zal er weer een percentage van de farmaceutische stoffen afgevallen zijn, waarvoor een tweede studie naar ontwikkelingstoxiciteit overbodig is geworden. Hierdoor zal het proefdiergebruik verminderen. Dergelijke scenario's worden thans in het samenwerkingsverband afgewogen.

3.7 Effect op de regelgeving

Regelgevers zijn op dit moment betrokken bij de verschillende activiteiten om de huidige ICH S5(R2) regelgeving aan te passen en om voorstellen te doen om nieuwe teststrategieën voor ontwikkelingstoxiciteit te testen en daarbij minder gebruik te maken van de vergelijking tussen rat en konijn. Stakeholders betrokken bij de database analyse zijn ook nauw betrokken bij de discussie over de ontwikkeling van de regelgeving. De resultaten zullen dan ook uitgebreid worden besproken in relevante internationale gremia om zo draagvlak te creëren om veranderingen met betrekking tot de 3 V's in de wettelijke kaders te implementeren (Theunissen et al., 2014).

3.8 Toekomstplannen / aanbevelingen met betrekking tot database

- Nader onderzoek van de database is nodig om goed geïnformeerde keuze te kunnen maken voor een diersoort van eerste keuze. Dit onderzoek zal zeker bij HESI-DART een prioritair aandachtsgebied blijven. Gedacht wordt aan een scenario waarbij een beslisboom wordt opgesteld die allereerst bepaalt wat de species van eerste keuze is afhankelijk van de eigenschappen van een te testen stof. Vervolgens worden criteria afgeleid om op basis van de uitkomst van de studie in de eerste species te bepalen of en wanneer in het ontwikkelingsproces naar geneesmiddel een tweede studie nodig is. Daarbij moet zorgvuldig worden bewaakt dat het huidige niveau van risicoschatting gehandhaafd blijft.
- Aan de hand van deze resultaten zullen er minimaal twee wetenschappelijke publicaties worden geschreven in samenwerking met de betrokken partijen (stakeholders van industrie, overheid en academia). Deze studies zullen in internationale regelgevende gremia zoals ICH en EMA de lopende discussie over vermindering van proefdiergebruik in de ontwikkelingstoxicologie richting geven en vernieuwing bevorderen. Zelfs een gedeeltelijke uitfasering van dit onderzoek in een van beide diersoorten zal dus al een substantiële besparing van proefdiergebruik kunnen opleveren. Het RIVM blijft ook in 2015 een leidende rol spelen bij deze discussie. De tijd is rijp voor goed onderbouwde aanpassingen. Niettemin hangt invoering van vernieuwing af van internationale instemming, wat naar verwachting nog enkele jaren zal vergen.
- In vervolg op de database analyse over ontwikkelingstoxiciteitstesten in twee species, is geopperd om alternatieve testen als eventuele vervanger voor een tweede species te overwegen, door bijvoorbeeld gebruik te maken van de muis embryonale stamceltest (mEST). Deze

optie is opgekomen tijdens het project, maar nog niet concreet onderzocht.

- De database genereert internationaal veel belangstelling. Dit heeft doen besluiten dat de database in 2015 wordt ondergebracht bij HESI-DART. Dit maakt de database breder toegankelijk en zal het draagvlak voor vermindering van dierstudies verder kunnen vergroten. De database maakt meer belangrijke analyses mogelijk dan tot nog toe uitgevoerd konden worden en deze zullen nog volgen in 2015. Dit zal voorstellen tot aanpassingen in de regelgeving verder onderbouwen en aanscherpen.

4 Referenties

- Cooper, R. L., Lamb, J. C., Barlow, S. M., Bentley, K., Brady, A. M., Doerrer, N. G., Eisenbrandt, D. L., Fenner-Crisp, P. A., Hines, R. N., Irvine, L. F., Kimmel, C. A., Koeter, H., Li, A. A., Makris, S. L., Sheets, L. P., Speijers, G., and Whitby, K. E. (2006). A tiered approach to life stages testing for agricultural chemical safety assessment. *Crit Rev Toxicol* **36**, 69-98.
- Hessel, E. V. S., Tonk, E. C. M., Bos, P. M. J., van Loveren, H., and Piersma, A. H. (in press). Developmental immunotoxicity of chemicals in rodents and its possible regulatory impact. *Critical Reviews in Toxicology*.
- Hurt, M. E., Cappon, G. D., and Browning, A. (2003). Proposal for a tiered approach to developmental toxicity testing for veterinary pharmaceutical products for food-producing animals. *Food Chem Toxicol* **41**, 611-9.
- ICH (2005). ICH harmonized tripartite guideline: detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5(R2).
- Janer, G., Slob, W., Hakkert, B. C., Vermeire, T., and Piersma, A. H. (2008). A retrospective analysis of developmental toxicity studies in rat and rabbit: what is the added value of the rabbit as an additional test species? *Regul Toxicol Pharmacol* **50**, 206-17.
- Knudsen, T. B., Martin, M. T., Kavlock, R. J., Judson, R. S., Dix, D. J., and Singh, A. V. (2009). Profiling the activity of environmental chemicals in prenatal developmental toxicity studies using the U.S. EPA's ToxRefDB. *Reprod Toxicol* **28**, 209-19.
- Piersma, A. H., Rorije, E., Beekhuijzen, M. E., Cooper, R., Dix, D. J., Heinrich-Hirsch, B., Martin, M. T., Mendez, E., Muller, A., Paparella, M., Ramsingh, D., Reaves, E., Ridgway, P., Schenk, E., Stachiw, L., Ulbrich, B., and Hakkert, B. C. (2011). Combined retrospective analysis of 498 rat multi-generation reproductive toxicity studies: on the impact of parameters related to F1 mating and F2 offspring. *Reprod Toxicol* **31**, 392-401.
- Rorije, E., van Hienen, F. J., Dang, Z. C., Hakkert, B. H., Vermeire, T., and Piersma, A. H. (2012). Relative parameter sensitivity in prenatal toxicity studies with substances classified as developmental toxicants. *Reprod Toxicol* **34**, 284-90.
- Schardein, J. (2000). Chemically induced birth defects. 3rd ed. New York: Marcel Decker Inc.
- Shepard, T. H. (1998). Catalog of teratogenic agents. . 9th ed. Baltimore, MD: Johns Hop-kins University Press;.
- Theunissen, P. T., Bekend, S., Capponf, G. D., Cheng, C., Hobermanh, A. M., van der Laan, J. W., Stewart, J., and Piersma, A. H. (2014). Report Toward a comparative retrospective analysis of rat and rabbit developmental toxicity studies for pharmaceutical compounds. *Reproductive Toxicology* **47**, 27-32.
- Vandebriel, R. J., van der Laan, J. W., and Piersma, A. H. (2012). Knelpunten in de keten van 3V-testen voor ontwikkelings- en reproductietoxiciteit Plan van Aanpak. RIVM briefrapport 340008002.

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag