

DIAMO VOCE ALLA RICERCA DEL XXI SECOLO ED ABBRACCIAMO IL CAMBIAMENTO

Incentivare la promozione e lo sviluppo di una ricerca biomedica rilevante ed eticamente sostenibile

PREMESSO CHE:

- L'inadeguatezza dell'attuale paradigma di ricerca, basato su modelli *in vitro* semplicistici e/o modelli animali, è ormai da tempo riconosciuta presso la Comunità Scientifica (1-12).
- Alla luce delle più recenti conquiste nel campo delle biotecnologie e delle nuove tecnologie oggi disponibili è riconosciuta la necessità urgente di un cambio di paradigma, spostando il focus da una ricerca prevalentemente focalizzata su modelli *in vitro* inadeguati e/o sulla biologia animale, ad una ricerca che si serva di tecnologie ed approcci moderni e fisiologicamente rilevanti e permetta di studiare i processi fisio-patologici umani in un contesto specie-specifico, agevolando la scoperta di farmaci utili all'uomo e garantendo una maggiore sicurezza per la collettività (13-27);
- Diverse organizzazioni scientifiche* che riuniscono scienziati, istituzioni e portatori di interesse a livello internazionale, sostengono la necessità di promuovere lo sviluppo e l'applicazione integrata di Nuovi Approcci Metodologici (NAM)** focalizzati sulla biologia umana (in inglese *human-based*), sulla base dell'inadeguatezza degli approcci tradizionali, incentrati sul modello animale;
- I NAM si sono già dimostrati migliori dei modelli tradizionali nel predire le risposte dell'organismo umano (28-33);
- Con il documento pubblicato nel 2007 dal National Research Council statunitense "Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy" (34) il settore della tossicologia si è avviato verso un cambiamento epocale, che ha visto il passaggio da sistemi basati su animali, a sistemi *in vitro* e *in silico* che impiegano cellule umane e che integrati assieme si ritiene possano dare risposte più rilevanti ed affidabili sugli effetti delle sostanze chimiche sull'organismo umano;
- Nel 2012, l'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) ha lanciato un programma per lo sviluppo di "Adverse Outcome Pathways" (AOPs), traducibile come "vie degli esiti avversi". Gli AOPs vengono creati per riassumere le informazioni relative agli effetti di sostanze chimiche ambientali o di qualsiasi altra sostanza, descrivendo nei dettagli i meccanismi sia cellulari che molecolari (a livello di geni e proteine) alla base di questi effetti, prendendo in considerazione diversi livelli di complessità biologica (popolazione, individuo, organo, tessuto, cellula, e molecole) (35, 36). L'organizzazione delle conoscenze riguardanti gli effetti delle sostanze chimiche tramite AOPs può essere agevolmente applicata, oltre che in campo tossicologico, anche al settore della ricerca biomedica, ad esempio per identificare i segnali molecolari che vengono alterati con l'insorgenza di una specifica malattia (14, 37);
- I NAM permettono di ottenere risultati rilevanti per l'organismo umano, in tempi relativamente veloci, e si sono già rivelati importanti e molto promettenti per lo studio di SARS-Cov2, la comprensione dei meccanismi sottostanti a COVID-19, il miglioramento della diagnosi e lo sviluppo di nuove terapie e vaccini (38-47);
- la Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (48) incoraggia l'utilizzo di metodi alternativi alla sperimentazione animale;

O.S.A. - Oltre la Sperimentazione Animale

Via Vigorelli, 3 – 20054 Segrate (MI)

<https://oltrelasperimentazioneanimale.eu>

- L'Olanda si è prefissata lo scopo di diventare leader dei metodi scientifici senza animali entro il 2025 e per raggiungere questo obiettivo sta mettendo in atto una serie di azioni mirate e profumatamente finanziate che hanno creato laboratori di ricerca all'avanguardia;
- L' EPA (Environmental Protection Agency) statunitense, ha annunciato di non voler più utilizzare mammiferi per valutazioni tossicologiche entro il 2035 (49). Per arrivare a questo traguardo ha stanziato oltre 4 milioni di dollari per la ricerca, che si aggiungono alle centinaia già erogati nell'ambito della messa a punto di metodi tossicologici basati su colture cellulari umane (vedere progetti ToxCast e Tox21) (50, 51);
- In Italia non esistono attualmente dei programmi specifici o dei piani vincolanti tesi al superamento dei vecchi paradigmi di ricerca e all'implementazione e sviluppo di NAM *human-based* e le risorse umane ed economiche destinate a tali propositi sono ancora scarse, come inadeguate sono le infrastrutture e le politiche educative per la formazione di giovani ricercatori, che per questo sono spesso costretti a spostarsi all'estero.

La **Comunità Scientifica**, rappresentata dai firmatari del presente Manifesto/lettera aperta, promosso dall'Associazione scientifica OSA (Oltre la Sperimentazione Animale),

CHIEDE:

- Che vengano erogati finanziamenti strategici per incentivare lo sviluppo e l'utilizzo di NAM *human-based* ;
- Il miglioramento dell'educazione a tutti i livelli, nonché l'adeguata formazione di studenti e giovani ricercatori, sulle potenzialità dei NAM ed i limiti degli approcci tradizionali sia *in vitro* che su animali;
- L' introduzione dei NAM focalizzati sulla biologia umana nelle normative e linee guida sullo sviluppo di farmaci;
- L' inclusione di esperti in NAM tra i revisori di progetti di ricerca sottomessi per l'ottenimento di fondi;
- La creazione di infrastrutture adeguate per fornire supporto pratico ai giovani ricercatori che utilizzano NAM;
- Che venga adottata ogni iniziativa utile per sfruttare i potenziali scientifici ed economici dei NAM incentrati sulla biologia umana garantendo una maggiore sicurezza per la collettività, prevenzione e cura più efficace delle malattie e permettendo al nostro Paese di allinearsi con il resto dell'Europa e del mondo.

Note

*Esempi di organizzazioni scientifiche che promuovono I NAM e la ricerca focalizzata sulla biologia umana sono: BioMed 21 (<https://biomed21.org>), Alliance for human-relevant Science (<https://www.humanrelevantscience.org/>), Canadian Centre for Alternatives to Animal Methods (<http://www.uwindsor.ca/ccaam/>), Animal free Safety Assesment (<https://www.afsacollaboration.org/>), Center for Contemporary Sciences (<https://www.contemporarysciences.org/>)

** Si definiscono **Nuovi Approcci Metodologici (NAM)** tutti quegli approcci, metodologie e tecnologie che non fanno uso di animali e che possono essere utilizzati, da soli o in combinazione tra loro, per ottenere informazioni sugli effetti di sostanze chimiche o farmaci, o per studiare i meccanismi che sottintendono alle malattie umane (52, 53). Per approfondimenti sui NAM *human-based* si invita alla consultazione della letteratura e delle fonti specifiche , ad es. (54-57).

O.S.A. - Oltre la Sperimentazione Animale

Via Vigorelli, 3 – 20054 Segrate (MI)

<https://oltrelasperimentazioneanimale.eu>

Riferimenti bibliografici

1. Mak IW, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *American journal of translational research*. 2014;6(2):114-8.
2. Pound P, Ritskes-Hoitinga M. Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. *Journal of translational medicine*. 2018;16(1):304.
3. Leist M, Hartung T. Inflammatory findings on species extrapolations: humans are definitely no 70-kg mice. *Archives of toxicology*. 2013;87(4):563-7.
4. Hartung T. Look back in anger - what clinical studies tell us about preclinical work. *Altex*. 2013;30(3):275-91.
5. Attarwala H. TGN1412: From Discovery to Disaster. *Journal of young pharmacists : JYP*. 2010;2(3):332-6.
6. van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V, et al. Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS medicine*. 2010;7(3):e1000245.
7. Field M, Kersbergen I. Are animal models of addiction useful? 2019;0(0).
8. Van Norman GA. Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Is it Time to Rethink Our Current Approach? *JACC Basic Transl Sci*. 2019;4(7):845-54.
9. Bailey J, Thew M, Balls M. Predicting human drug toxicity and safety via animal tests: can any one species predict drug toxicity in any other, and do monkeys help? *Alternatives to laboratory animals : ATLA*. 2015;43(6):393-403.
10. Bailey J. Does the stress of laboratory life and experimentation on animals adversely affect research data? A critical review. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*. 2018;46(5):291-305.
11. Greek R, Pippus A, Hansen LA. The Nuremberg Code subverts human health and safety by requiring animal modeling. *BMC medical ethics*. 2012;13:16.
12. Akhtar A. The flaws and human harms of animal experimentation. *Cambridge quarterly of healthcare ethics : CQ : the international journal of healthcare ethics committees*. 2015;24(4):407-19.
13. Begley CG, Ellis LM. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature*. 2012;483(7391):531-3.
14. Langley GR, Adcock IM, Busquet F, Crofton KM, Csernok E, Giese C, et al. Towards a 21st-century roadmap for biomedical research and drug discovery: consensus report and recommendations. *Drug Discov Today*. 2017;22(2):327-39.
15. van de Stolpe A, Kauffmann RH. Innovative human-specific investigational approaches to autoimmune disease. *RSC Advances*. 2015;5(24):18451-63.
16. Langley GR. Considering a new paradigm for Alzheimer's disease research. *Drug Discov Today*. 2014;19(8):1114-24.
17. Davis MM. A prescription for human immunology. *Immunity*. 2008;29(6):835-8.
18. Tralau T, Riebeling C, Pirow R, Oelgeschlager M, Seiler A, Liebsch M, et al. Wind of change challenges toxicological regulators. *Environ Health Perspect*. 2012;120(11):1489-94.
19. Archibald K, Drake T, Coleman R. Barriers to the Uptake of Human-based Test Methods, and how to Overcome Them. 2015;43(5):301-8.
20. Tralau T, Luch A. Drug-mediated toxicity: illuminating the 'bad' in the test tube by means of cellular assays? *Trends in pharmacological sciences*. 2012;33(7):353-64.
21. Archibald K, Tsaion K, Kenna JG, Pound P. Better science for safer medicines: the human imperative. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2018;141076818812783.
22. Herrmann K, Pistollato F, Stephens ML. Beyond the 3Rs: Expanding the use of human-relevant replacement methods in biomedical research. *Altex*. 2019;36(3):343-52.
23. Pistollato F, Cavanaugh SE, Chandrasekera PC. A Human-Based Integrated Framework for Alzheimer's Disease Research. *J Alzheimers Dis*. 2015;47(4):857-68.

24. Cassotta M, Pistollato F, Battino M. Rheumatoid arthritis research in the 21st century: Limitations of traditional models, new technologies, and opportunities for a human biology-based approach. *Altex*. 2020;37(2):223-42.
25. Marshall LJ, Triunfol M, Seidle T. Patient-Derived Xenograft vs. Organoids: A Preliminary Analysis of Cancer Research Output, Funding and Human Health Impact in 2014-2019. *Animals : an open access journal from MDPI*. 2020;10(10).
26. Pistollato F, Bernasconi C, McCarthy J, Campia I, Desaintes C, Wittwehr C, et al. Alzheimer's Disease, and Breast and Prostate Cancer Research: Translational Failures and the Importance to Monitor Outputs and Impact of Funded Research. *Animals : an open access journal from MDPI*. 2020;10(7):1194.
27. Marshall LJ, Rowan AN. Advances in alternative non-animal testing methods represent a way to find new treatments for patients. *European journal of internal medicine*. 2018;48:e31-e2.
28. Barrile R, van der Meer AD, Park H, Fraser JP, Simic D, Teng F, et al. Organ-on-Chip Recapitulates Thrombosis Induced by an anti-CD154 Monoclonal Antibody: Translational Potential of Advanced Microengineered Systems. 2018;104(6):1240-8.
29. Thomas H. AI more accurate than animal testing for spotting toxic chemicals 2019 [Available from: <https://theconversation.com/ai-more-accurate-than-animal-testing-for-spotting-toxic-chemicals-99708>].
30. Goyal G, Long J, Ingber DE. Microengineered human lymphoid tissue on chip. *Cancer Immunology Research*. 2018;6(9 Supplement):A76.
31. Ahmed S, Bibby L, Dickinson A. Predicting adverse immune reactions to biopharmaceuticals using a human in-vitro skin explant test: a promising tool for biopharmaceutical R&D development. 2017.
32. Ahmed SS, Whritenour J, Ahmed MM, Bibby L, Darby L, Wang XN, et al. Evaluation of a human in vitro skin test for predicting drug hypersensitivity reactions. *Toxicology and applied pharmacology*. 2019;369:39-48.
33. Passini E, Britton OJ, Lu HR, Rohrbacher J, Hermans AN, Gallacher DJ, et al. Human In Silico Drug Trials Demonstrate Higher Accuracy than Animal Models in Predicting Clinical Pro-Arrhythmic Cardiotoxicity. 2017;8(668).
34. NRC N-R-C. *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*. Washington, DC: The National Academies Press; 2007. 216 p.
35. HumamToxomeProject. [Available from: <http://human-toxome.com/>].
36. AFSA. Animal Free Safety Assesment collaboration [Available from: <https://www.afsacollaboration.org/>].
37. Langley G, Austin CP, Balapure AK, Birnbaum LS, Bucher JR, Fentem J, et al. Lessons from Toxicology: Developing a 21st-Century Paradigm for Medical Research. *Environ Health Perspect*. 2015;123(11):A268-72.
38. Zhou H, Liu LP, Fang M, Li YM, Zheng YW. A potential ex vivo infection model of human induced pluripotent stem cell-3D organoids beyond coronavirus disease 2019. *Histology and histopathology*. 2020:18223.
39. Tárnok A. Machine Learning, COVID-19 (2019-nCoV), and multi-OMICS. *Cytometry A*. 2020;97(3):215-6.
40. Si L, Bai H, Rodas M, Cao W, Oh CY, Jiang A, et al. Human organs-on-chips as tools for repurposing approved drugs as potential influenza and COVID19 therapeutics in viral pandemics. *bioRxiv*. 2020:2020.04.13.039917.
41. Monteil V, Kwon H, Prado P, Hagelkrüys A, Wimmer RA, Stahl M, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell*. 2020;181(4):905-13.e7.
42. Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, Knoops K, Puschhof J, Breugem TI, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science (New York, NY)*. 2020.
43. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. The landscape of lung bronchoalveolar immune cells in COVID-19 revealed by single-cell RNA sequencing. *medRxiv*. 2020:2020.02.23.20026690.

44. Alimadadi A, Aryal S, Manandhar I, Munroe PB, Joe B, Cheng X. Artificial intelligence and machine learning to fight COVID-19. *Physiol Genomics*. 2020;52(4):200-2.
45. Busquet F, Hartung T, Pallocca G, Rovida C, Leist M. Harnessing the power of novel animal-free test methods for the development of COVID-19 drugs and vaccines. *Archives of toxicology*. 2020.
46. Chakraborty J, Banerjee I, Vaishya R, Ghosh S. Bioengineered in Vitro Tissue Models to Study SARS-CoV-2 Pathogenesis and Therapeutic Validation. *ACS biomaterials science & engineering*. 2020;6(12):6540-55.
47. Custódio TF, Das H, Sheward DJ, Hanke L, Pazicky S, Pieprzyk J, et al. Selection, biophysical and structural analysis of synthetic nanobodies that effectively neutralize SARS-CoV-2. *Nature Communications*. 2020;11(1):5588.
48. Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici 2010. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32010L0063>.
49. EPA. [Available from: <https://www.epa.gov/research/epa-new-approach-methods-efforts-reduce-use-animals-chemical-testing>].
50. Attene-Ramos MS, Miller N, Huang R, Michael S, Itkin M, Kavlock RJ, et al. The Tox21 robotic platform for the assessment of environmental chemicals--from vision to reality. *Drug Discov Today*. 2013;18(15-16):716-23.
51. Richard AM, Judson RS, Houck KA, Grulke CM, Volarath P, Thillainadarajah I, et al. ToxCast Chemical Landscape: Paving the Road to 21st Century Toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2016;29(8):1225-51.
52. ICCVAM. A Strategic Roadmap for Establishing New Approaches to Evaluate the Safety of Chemicals and Medical Products in the United States 2018 [Available from: <https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/natl-strategy/index.html>].
53. New Approach Methodologies for Biomedical Research [Available from: <https://complexitybiosystems.it/en/events/new-approach-methodologies-nam-for-biomedical-research>].
54. Ward SE. Human-Based Systems for Translational Research. Edited by Robert Coleman. 2015;10(7):1273-4.
55. Cassotta M, Marchi V. Le nuove frontiere della scienza. Modelli sperimentali per la ricerca biomedica del XXI secolo: Aracne; 2019.
56. The NAT database (Non-Animal Technologies) [Available from: <https://nat-database.org/>].
57. ECVAM. Review of advanced non-animal models in biomedical research [Available from: <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/knowledge-sharing-3rs/life-science-research>].