

## Metodi alternativi, loro accettazione e utilizzo: quali sfide rimangono da affrontare?

*Alternative methods, their acceptance and use: what challenges remain to be addressed?*

FRANCESCA PISTOLLATO

Ph.D Humane Society International (HSI), Europa

Per corrispondenza:  
francesca.pistollato@gmail.com

### Riassunto

Nell'ultima decade, si è osservato un crescente ed esponenziale sviluppo di modelli innovativi comunemente definiti NAMs (*new approach methodologies*), alternativi alla sperimentazione animale e basati sulla specie umana, nello sforzo comune d'incrementare l'affidabilità e la predittività dei risultati ottenuti sia nell'ambito della ricerca biomedica che in ambito regolatorio, e parallelamente ridurre (e idealmente evitare) l'uso di animali finalizzati a questi scopi. Tuttavia, recenti analisi suggeriscono che il numero di animali utilizzati a scopi scientifici non sia diminuito significativamente negli ultimi anni, soprattutto guardando a quelli antecedenti la recente pandemia da COVID19. In questo breve articolo, vengono discusse le principali sfide di natura tecnico/scientifica, di carattere conoscitivo, normativo/regolatorio, ed economiche/finanziarie che attualmente rimangono da affrontare affinché i modelli innovativi basati sulla specie umana possano essere ampiamente accettati e utilizzati.

**Parole chiave:** Nuovi approcci metodologici; sfide; normative; convalida; bandi di finanziamento.

### Abstract

*In the last decade, there has been a growing and exponential development of innovative models commonly defined as NAMs (new approach methodologies), alternatives to animal experimentation and based on the human species, in the common effort to increase the reliability and predictability of the results obtained both in biomedical research and in regulatory testing, and at the same time to reduce (and ideally avoid) the use of animals for these purposes. However, recent analyzes suggest that the number of animals used for scientific purposes has not significant-*

*ly decreased in recent years, especially when looking at those before the recent COVID19 pandemic. In this short article, I discuss what technical/scientific, cognitive, legislative/regulatory, and economic/financial challenges currently remain to be addressed in order for innovative models to be widely accepted and used.*

**Keywords:** NAMs; challenges; regulations; validation; funding calls.

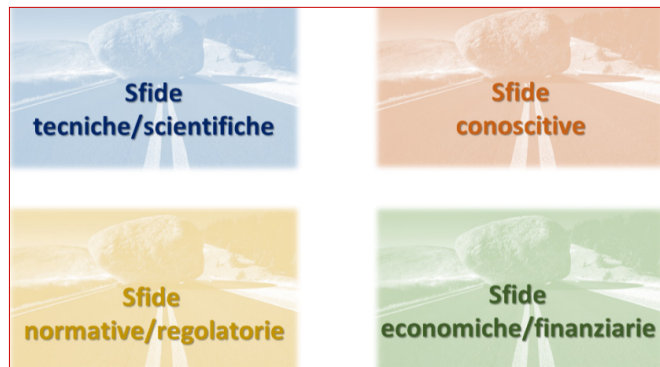
### ■ Introduzione

Negli ultimi anni la ricerca scientifica, di base e traslazionale, e in ambito regolatorio ha visto un crescente sviluppo, disseminazione e utilizzo di modelli innovativi comunemente definiti NAMs (*new approach methodologies*), alternativi alla sperimentazione animale nel tentativo comune e condiviso d'incrementare l'affidabilità e la predittività dei risultati e delle evidenze scientifiche, questo anche in risposta alla Direttiva UE 2010/63 che norma l'utilizzo degli animali utilizzati a scopi scientifici e promuove l'applicazione del principio delle tre R (Replacement (sostituzione), Refinement (perfezionamento), Reduction (riduzione)).

Tuttavia, nonostante gli investimenti a livello europeo in questa direzione, soprattutto nei più recenti programmi quadro di finanziamento alla ricerca (Horizon 2020 (H2020), ed Horizon Europe), il numero degli animali utilizzati a scopi scientifici non è diminuito significativamente negli ultimi anni. Una recente analisi ha infatti evidenziato che l'uso di animali nella ricerca di base e traslazionale nell'Unione Europea fra il 2015 e il 2018 non ha subito alcun declino stabile, considerando anche che il 70% di animali è destinato alla ricerca biomedica di base per la quale non è previsto alcun obbligo di utilizzo di ani-

mali<sup>1</sup>.

Numerose sono le sfide che devono essere superate per promuovere un'ampia accettazione dei NAMs, in particolare si possono annoverare sfide di natura tecnico/scientifica, di carattere conoscitivo, normativo/regolatorio, ed economiche/finanziarie (Figura 1).



**Figura 1:** Principali sfide da affrontare per un'ampia accettazione e utilizzo dei metodi innovativi basati sulla specie umana (NAMs).

In questo breve articolo, vengono prese in considerazione le principali sfide che attualmente si devono affrontare affinché i modelli innovativi basati sulla specie umana possano essere ampiamente accettati e utilizzati, nell'auspicio che ciò possa di conseguenza determinare una diminuzione significativa del numero di animali utilizzati per scopi scientifici.

## ■ Sfide tecniche e scientifiche

Fra le possibili sfide di carattere tecnico/scientifico, è riconosciuta la necessità di caratterizzare sempre meglio e, idealmente, convalidare i nuovi modelli *in vitro* complessi, quali quelli in 3D (sferoidi, organoidi, ecc.), organ-on-chip e microfluidici, oltre ad armonizzare l'uso di definizioni e nomenclature comuni<sup>2</sup>. Recenti lavori hanno evidenziato l'importanza di definire controlli di qualità specifici per i più recenti modelli cellulari, come riportato da Pamies e co-autori<sup>3</sup>.

Vi è, altresì, la necessità di migliorare l'accesso e la distribuzione dei tessuti e delle cellule umane raccolti dalle bio-banche, assicurando alti standard di qualità, come indicato dall'OECD (OCSE), che ha definito raccomandazioni specifiche per l'approvvigionamento di cellule e tessuti, lo screening dei contaminanti, l'analisi di biomarcatori del modello cellulare/tissutale e i relativi test funzionali, considerando che questi elementi possono influenzare vari aspetti del metodo *in vitro*<sup>1</sup>.

Inoltre, anche le tecniche di (neuro)imaging e computazionali sono in fase di continuo sviluppo, e recentemente la riproducibilità e la convalida dei modelli computazionali (*o in silico*), che essenzialmente prevede che, tramite l'uso di un certo software, per lo stesso input

chiunque ottenga lo stesso risultato, indipendente dal fatto che sia giusto o sbagliato, è stata discussa in recenti lavori, quale ad esempio<sup>4</sup>.

## ■ Sfide conoscitive

Le sfide legate alla conoscenza sono fra le più complesse da affrontare, considerata anche la natura epistemologica delle stesse. In ambito scientifico, come anche in campo medico, vi è spesso una generale riluttanza a cambiare un qualsivoglia approccio metodologico consolidato da tempo (e con il quale precedenti finanziamenti possono essere stati ottenuti o che è stato oggetto di pubblicazioni scientifiche), a favore di uno nuovo e meno conosciuto, seppur tecnologicamente più avanzato e affidabile. Questo aspetto è stato anche recentemente discusso dal NC3Rs (un'organizzazione scientifica con sede nel Regno Unito che lavora a livello nazionale e internazionale con la comunità di ricerca per sostituire, perfezionare e ridurre l'uso di animali nella ricerca e nella sperimentazione) nel suo recente documento strategico<sup>5</sup>. È opportuno riconoscere le barriere significative che impediscono l'adozione di modelli innovativi basati sulla specie umana; anche quando i dati pubblicati indicano in molti casi una maggiore capacità predittiva di questi modelli rispetto a modelli *in vitro* più semplici (es. colture in 2D) o ai tradizionali modelli animali<sup>6</sup>, il cambiamento nell'approccio metodologico non appare evidente. Un'ulteriore barriera è anche rappresentata dalla polarizzazione dei punti di vista all'interno della società, che può inibire la comunicazione e le collaborazioni, fondamentali per cambiare percezioni e pratiche<sup>5</sup>.

Altro aspetto da considerare è talvolta la mancanza di know-how o conoscenza degli attuali modelli basati sulla specie umana, come conseguenza di una mancata esposizione a informazioni o aggiornamenti scientifici. Tali corsi di formazione e training sono stati mappati nel 2019 dal Centro comune di ricerca (CCR, JRC) della Commissione Europea, che ha pubblicato un inventario dei corsi e delle risorse disponibili per l'istruzione e la formazione sul principio delle 3R. Lo scopo di questa raccolta di dati, intrapresa tra giugno e settembre 2018, è stata quella di fornire una panoramica dei corsi e delle risorse di istruzione e training sulla teoria e l'applicazione delle 3R offerte a livello di scuola secondaria superiore, universitario e professionale in tutto il mondo (per un totale di 569 corsi e risorse mappate)<sup>7</sup>.

Inoltre, anche la fruizione di big data risulta talvolta inefficace, così come anche l'archiviazione a lungo termine dei dati scientifici (conservazione dei dati) e l'applicazione del concetto "open data". Se i dati misurati vengono perduti o non possono più essere letti o interpretati, le informazioni sono perse per sempre. Incentivare pratiche di "open data" e "open access" permette di rendere i dati liberamente disponibili a tutti in una forma che consenta anche ai non esperti di utilizzarli e ottenerne risultati scientifici. Ciò presuppone il rendere "open" (aperto) il formato dei dati, con l'accurata annotazione sia di dati che metadati. Recenti iniziative sono

I. GIVIMP, Chapter 5. Test Systems. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264304796-10-en.pdf?expires=1692610901&id=id&accname=guest&checksum=8033C2B60AC152FD605AD8687483117D>

state avviate da alcuni enti finanziatori della ricerca per sviluppare e costruire infrastrutture di analisi e dati a livello nazionale ed europeo<sup>8</sup>.

Per meglio confrontare la capacità predittiva di diversi metodi e modelli e i dati estrapolati da studi *in vivo* e *in vitro* (o *in silico*), è importante altresì incentivare studi IVIVE (*in vitro/in vivo extrapolation*), così come anche studi di *systematic review*. Recentemente, un modello di fegato su chip (*liver-on-chip*) sviluppato dalla company Emulate ha dimostrato una capacità superiore al modello animale (o ad altri modelli *in vitro* semplici) nel predire il danno epatico indotto da farmaco (o *drug-induced liver injury, DILI*), che rappresenta una delle principali cause di fallimento della sperimentazione clinica correlata alla sicurezza e il conseguente ritiro dal mercato<sup>9,10</sup>. In particolare, tale modello ha dimostrato un'elevata sensibilità, equivalente al 87%, nell'identificare farmaci che sono stati approvati per studi clinici dopo essere stati testati sia su animali che su sistemi *in vitro*, ma che alla fine si sono rivelati epatotossici nell'uomo (il *liver-on-chip* ha rilevato il rischio di DILI per quasi 7 farmaci epatotossici su 8 riscontrati). Studi di comparazione analoghi a questo permetteranno di consolidare maggiormente il grado di fiducia nell'utilizzo di tali modelli innovativi.

Altro aspetto rilevante da evidenziare in ambito conoscitivo è la mancanza (o la scarsa rappresentanza) di revisori esperti nell'uso di modelli innovativi basati sulla specie umana, sia nell'ambito della valutazione di progetti scientifici che durante il processo di revisione di articoli *peer-reviewed*. Talvolta i revisori di un articolo scientifico richiedono un raffronto dei dati ottenuti *in vitro* (o *in silico*) con dati *in vivo*, nella consolidata convinzione che il modello animale rappresenti ancora il "gold standard" di riferimento in ambito di ricerca biomedica o in tossicologia<sup>11</sup>. Il problema del cosiddetto "terzo revisore" è stato recentemente evidenziato anche dal Dott. Donald Ingber, il quale sostiene che sia ormai tempo di richiedere la convalida o la conferma di evidenze ottenute *in vitro* utilizzando modelli complessi *in vitro* (quali gli organi su chip), piuttosto che modelli animali<sup>12</sup>.

### ■ Sfide normative e regolatorie

È evidente che un cambio di passo a livello legislativo e normativo rappresenta uno step essenziale affinché tali modelli sperimentali possano essere ampiamente accettati e utilizzati dalla comunità scientifica. Un recente ed eclatante passo in questa direzione è rappresentato dal recente *FDA Modernization Act 2.0*<sup>13</sup>, una legge approvata e firmata a dicembre 2022 negli Stati Uniti che autorizza l'uso di alcuni modelli alternativi alla sperimentazione animale, inclusi test cellulari e modelli computerizzati, per ottenere un'esenzione da parte della Food and Drug Administration (FDA) per verificare la sicurezza e l'efficacia di un nuovo farmaco. Anche l'India si è allineata a questa posizione, passando un simile emendamento di legge che mira a sostituire l'uso

degli animali nella ricerca, e in particolare nei test farmacologici<sup>14</sup>. Analogamente, anche l'Unione Europea, il Canada, il Brasile e altri paesi hanno compiuto progressi legislativi finalizzati a promuovere l'utilizzo di metodologie non-animale per lo sviluppo di nuovi farmaci. Sebbene in molti paesi lo sviluppo di questi metodi e modelli sperimentali sia ancora agli esordi, il superamento di queste barriere legislative rappresenta un forte incentivo per l'industria ad accelerare lo sviluppo e l'incorporazione di questi nuovi metodi nel loro portafoglio di attività interne, e ad istituire collaborazioni (partnership) multidisciplinari fra industria e università, al fine di supportare il processo decisionale in ambito normativo.

### ■ Sfide economiche e finanziarie

Per quanto concerne le sfide di natura economico/finanziaria, la porzione di investimenti destinati ai NAMs, a dispetto di quanto si possa credere, non appare ad oggi adeguata o sufficiente. Da un'analisi dei finanziamenti allocati da parte della Commissione Europea nel più recente programma di finanziamento alla ricerca (Horizon Europe)<sup>15</sup>, emerge che su un totale di 95,5 miliardi, sono 270 milioni gli euro destinati allo sviluppo e all'implementazione di modelli innovativi alternativi alla sperimentazione animale. Facendo un rapido calcolo, ciò si traduce in circa 45 milioni di euro/anno per un programma di sei anni. L'incremento di tale quota rispetto al precedente programma europeo H2020, è stato del 24%, significativamente inferiore rispetto all'incremento registrato nel passaggio da FP7 (settimo programma quadro) ad H2020, dove l'aumento era stato del 40%<sup>1</sup>.

Si deve anche considerare che, sebbene alcuni recenti bandi (o *calls for proposals*) incentivano la presentazione di progetti di ricerca basati sull'uso di NAMs sia per la ricerca di base che quella traslazionale, spesso il linguaggio adottato nella descrizione di questi bandi non sembra essere unidirezionale e coerente. Ad esempio, il JPND, il Programma comune dell'UE per la ricerca sulle malattie neurodegenerative, incentiva l'utilizzo di materiale clinico, coorti di pazienti e NAMs *human-based* (non-animale), ma al contempo enfatizza anche l'importanza di "migliorare gli attuali modelli animali", facendo riferimento anche a concetti quali la "reverse translation", per il quale la condizione umana è mappata su un modello animale appropriato o dati ottenuti da studi clinici vengono confrontati con dati ottenuti su animali<sup>16</sup>. È anche per questa mancanza di una chiara enfasi nel linguaggio dei più recenti bandi di finanziamento che non viene data priorità all'uso dei NAMs nell'agenda di ricerca, a dispetto dell'acclarato elevato tasso di fallimento (circa 90%) nel processo di sviluppo di farmaci, come conseguenza di una mancata efficacia e/o tossicità inaspettata o inspiegabile<sup>17</sup>.

È importante considerare che un'eventuale redistribuzione dei finanziamenti verso i NAMs presuppone anche la definizione di piani di cambiamento strutturale: ad esempio, un ente di ricerca che dovesse decidere di

destinare i propri finanziamenti (o parte di essi) verso attività di ricerca *animal-free*, dovrebbe anche programmare e attuare piani di riconversione di strutture, quali gli stabulari, per ridotto utilizzo. Oltre ai cambiamenti strutturali, un cambiamento di questo tipo presupporrebbe anche la riprogrammazione o l'introduzione di nuove competenze e opportunità di formazione, affinché la ricerca e le carriere del personale coinvolto non vengano compromesse, ma al contrario integrate in queste nuove attività.

## ■ Conclusioni

Le sfide che rimangono da affrontare per poter assistere ad un'ampia accettazione e utilizzo dei metodi innovativi (NAMs) basati sulla specie umana sono molteplici e di varia natura. Una generale reticenza nei confronti di questi nuovi approcci metodologici ed inerzia in parte della comunità scientifica e da parte di alcuni portatori di interesse, così come anche l'incapacità (o l'assenza di volontà) di abbracciare il cambiamento rappresentano probabilmente i principali ostacoli a questo cambio di paradigma. In Europa si è discussa l'adozione del principio del *"Just Transition"* in relazione al *Green Deal* europeo, per garantire che la transizione concreta verso un'economia climaticamente neutra avvenga in modo equo<sup>18</sup>. A dispetto delle ovvie differenze in magnitudine, lo stesso approccio potrebbe essere adottato anche in ambito scientifico, con la promozione di un cambiamento di paradigma verso modelli non-animale e più rilevanti per la specie umana. In ultima istanza, come sostiene il Prof. Thomas Hartung, *"non è più una questione se siamo abbastanza bravi con le alternative; è molto più una questione di transizione da una tecnologia all'altra... E' come quando siamo passati dalle carrozze alle automobili. Questo non è stato fatto cambiando un pezzo alla volta fino a quando la carrozza non sembrava un'auto, ma è stato fatto con tecnologie parallele fino a quando le persone hanno visto che i loro pregiudizi non erano più giustificati e la nuova tecnologia era semplicemente migliore"*<sup>19</sup>.

## Bibliografia

- [1] L. J. Marshall, H. Constantino, and T. Seidle, "Phase-In to Phase-Out—Targeted, Inclusive Strategies Are Needed to Enable Full Replacement of Animal Use in the European Union," *Anim. Open Access J. MDPI*, vol. 12, no. 7, p. 863, Mar. 2022, doi: 10.3390/ani12070863.
- [2] M. Piergiovanni et al., "Putting Science into Standards workshop on standards for organ-on-chip," *Stem Cell Rep.*, vol. 16, no. 9, pp. 2076–2077, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.stemcr.2021.07.010.
- [3] D. Pamies et al., "Guidance document on Good Cell and Tissue Culture Practice 2.0 (GCCP 2.0)," *ALTEX*, vol. 39, pp. 30–70, 2022, doi: 10.14573/altex.2111011.
- [4] G. Lerma-Usabiaga, N. Benson, J. Winawer, and B. A. Wandell, "A validation framework for neuroimaging software: The case of population receptive fields," *PLOS Comput. Biol.*, vol. 16, no. 6, p. e1007924, Jun. 2020, doi: 10.1371/journal.pcbi.1007924.
- [5] "Our strategy | NC3Rs." <https://nc3rs.org.uk/who-we-are/our-strategy> (accessed Aug. 21, 2023).
- [6] D. E. Ingber, "Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 23, no. 8, pp. 467–491, Aug. 2022, doi: 10.1038/s41576-022-00466-9.
- [7] M. Holloway, O. Florean, F. Busquet, L. Farcal, and A. Tenie, "Three Rs Education and Training Courses and Resources," Mar. 2019, Accessed: Aug. 21, 2023. [Online]. Available: <http://data.europa.eu/89h/d0569abb-b5ab-4b9e-9e16-d70cea7a89f9>
- [8] A. Heiss, "Big Data Challenges in Big Science," *Comput. Softw. Big Sci.*, vol. 3, no. 1, p. 15, Nov. 2019, doi: 10.1007/s41781-019-0030-7.
- [9] J. Wells, "Organ-Chips and Animal Models: Sensitivity Explained," *Emulate*, Jun. 06, 2023. <https://emulatebio.com/organ-chips-and-animal-models-sensitivity-explained/> (accessed Aug. 21, 2023).
- [10] L. Ewart et al., "Performance assessment and economic analysis of a human Liver-Chip for predictive toxicology," *Commun. Med.*, vol. 2, no. 1, Art. no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s43856-022-00209-1.
- [11] C. E. Krebs, A. Lam, J. McCarthy, H. Constantino, and K. Sullivan, "A survey to assess animal methods bias in scientific publishing," *ALTEX*, Jul. 2023, doi: 10.14573/altex.2210212.
- [12] D. E. Ingber, "Is it Time for Reviewer 3 to Request Human Organ Chip Experiments Instead of Animal Validation Studies?," *Adv. Sci. Weinh. Baden-Wurt. Ger.*, vol. 7, no. 22, p. 2002030, Nov. 2020, doi: 10.1002/advs.202002030.
- [13] R. [R-K. Sen. Paul, "S.5002 - 117th Congress (2021-2022): FDA Modernization Act 2.0," Sep. 29, 2022. <http://www.congress.gov/bill/117th-congress/senate-bill/5002> (accessed Aug. 21, 2023).
- [14] "Current Affairs | New Drugs and Clinical Trial Rules (2023)," Kamaraj IAS Academy in Chennai. <https://www.kamarajiasacademy.com/> (accessed Aug. 21, 2023).
- [15] "Horizon Europe," Jul. 17, 2023. [https://research-and-innovation.ec.europa.eu/funding/funding-opportunities/funding-programmes-and-open-calls/horizon-europe\\_en](https://research-and-innovation.ec.europa.eu/funding/funding-opportunities/funding-programmes-and-open-calls/horizon-europe_en) (accessed Aug. 22, 2023).
- [16] "Alignment Actions," JPND Neurodegenerative Disease Research. <https://neurodegenerationresearch.eu/initiatives/jpnd-alignment-actions/> (accessed Aug. 22, 2023).
- [17] D. Sun, W. Gao, H. Hu, and S. Zhou, "Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it?," *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 12, no. 7, pp. 3049–3062, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.apsb.2022.02.002.
- [18] "The Just Transition Mechanism." [https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal/finance-and-green-deal/just-transition-mechanism\\_en](https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal/finance-and-green-deal/just-transition-mechanism_en) (accessed Aug. 22, 2023).
- [19] S. Moutinho, "Researchers and regulators plan for a future without lab animals," *Nat. Med.*, pp. 1–4, Jun. 2023, doi: 10.1038/s41591-023-02362-z.