

Direction des Métiers Scientifiques (DMS)
Pôle 3
Pôle Non-clinique, pharmacocinétique clinique
et interactions médicamenteuses
Personne en charge : Paul Houeto
Numéro du document : 20210312_CR_CSP_SQNC

Comité scientifique permanent Sécurité et qualité des médicaments - Formation restreinte non clinique

Séance du 12 mars 2021 de 14h à 17h00

Ordre du jour

Points	Sujets abordés	pour audition, information, adoption ou discussion
1.	Introduction	
1.2	Point sur les déclarations d'intérêts (DPI) et les situations de conflits d'intérêts	Pour information
2.	Dossiers thématiques	
2.1	Audition partie prenante : Cherry Biotech	Pour discussion et avis
2.2	Organes sur puce : Analyse critique des données issues de la littérature	Pour discussion et avis

Participants

Nom des participants	Statut (modérateur, membre, évaluateur, ...)	Présent	Absent /excusé
Membres			
DEBRUYNE Danièle		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GATTACCECA Florence		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GUERBET Michel		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GUILLEMAIN Joël		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PETITCOLLOT Nicole		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PICARD Roger		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Autres			
CRAMER Jeremy	Partie prenante, Cherry Biotech	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GAUDRIault Pierre	Partie prenante, Cherry Biotech	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Nom des participants	Statut (modérateur, membre, évaluateur, ...)	Présent	Absent /excusé
ANSM			
BARDIN-LAFORGE	Evaluateur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
FABRE Isabelle	Chef de pôle CTROL	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
HOUETO Paul	Référent non clinique DMS, Modérateur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
LOUIN Gaelle	Chef de pôle 3 DMS		
MONIER Christine	Evaluateur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MORCOS Athina	Stagiaire pôle 3 DMS	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SALOMON Valérie	Directrice DMS	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SANH Alan	Evaluateur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

1. Introduction

1.1. Point sur les DPI et les situations de conflits d'intérêts

Tous les membres ont déclaré avoir complété leur DPI et n'ont pas à ce jour d'intérêt à déclarer notamment en lien avec cette thématique sur les organes sur puces.

Aucun lien n'a été identifié pour les membres et les experts

Lien(s) identifié(s)					
Dossier	Nom Prénom	Type de lien	Niveau de lien	Période	Si lien niveau 2
					Sorti <input type="checkbox"/> Absent <input type="checkbox"/> Présent <input type="checkbox"/>

Nom du dossier :

Numéro/type/nom du dossier	Méthodes alternatives : organes sur puces pour évaluer la toxicité et la pharmacocinétique des médicaments.
Laboratoire(s)	Cherry Biotech
Direction produit concernée	Direction des Métiers Scientifiques (DMS)
Expert(s)	

1.2. Tour de table

Après avoir souhaité la bienvenue aux participants, le modérateur ouvre la séance.

Un tour de table des participants a été effectué.

1. Dossiers thématiques

L'agence se préoccupe des technologies d'organes sur puces. C'est dans ce cadre qu'elle souhaite anticiper et cherche à amorcer une réflexion autour de ce sujet relatif à ces technologies innovantes de culture cellulaire en 3D et en conditions dynamiques dans la chaîne de développement de nouveaux médicaments.

Cette réflexion ne saurait aboutir sans le concours de parties prenantes (grandes entreprises pharmaceutiques, CRO, start-up, ...) qui sont des acteurs majeurs et concrets, capables de nous informer sur l'évolution de ces technologies d'organes sur puces.

Objectif

Cette troisième séance de travail vise à auditionner une partie prenante, en l'occurrence la société Cherry Biotech, spécialisée dans la conception de système d'organes sur puces.

Cette séance de travail est aussi consacrée à la restitution des travaux effectués par chaque expert dans l'analyse critique des données issues de la littérature. Ce recueil des travaux permettra d'identifier les points critiques de telles données dans le cadre d'une demande d'autorisation de mise sur le marché ou d'un essai clinique et d'élaborer le cas échéant des recommandations correspondantes.

La finalité de ce travail est d'élaborer une doctrine d'évaluation des technologies d'organes sur puce dans le processus de développement d'un candidat médicament.

1.1. Audition Cherry Biotech

La société Cherry Biotech a été associée à la réflexion par le biais de questions sur leur propre expérience de mise en œuvre de ces technologies, les verrous éventuels et les avancées majeures dans le domaine, afin de nous permettre de mieux appréhender les points ci-dessous :

- Quel est l'état des lieux de la recherche actuelle ?
- Les modèles existants à savoir :
 - o Les principaux modèles hépatiques
 - o Les autres modèles d'organes
 - o Les modèles associant plusieurs organes
 - o Les domaines d'application
- Les avantages et les limites de ces systèmes
- Existe-t-il un consensus sur des modèles validés ?
- Les futurs projets
- Les bénéfices apportés par l'intégration de ces technologies : quel impact sur l'expérimentation animale ?
- Quelles sont les molécules pharmaceutiques testées ou susceptibles d'être testées ?
- Ces modèles ont-ils permis de prédire des toxicités *in vivo* en particulier chez l'homme, non décelées avec les modèles *in vitro* classiques ?
- Ces technologies sont-elles utilisées en routine ou uniquement à des fins de recherche ?
- Quels sont les autres systèmes de couplage, par exemple la modélisation PBPK ou les approches « omics » ?.

Présentation

Cherry Biotech est une entreprise fondée en 2014 et spécialisée dans la conception de systèmes microphysiologiques de contrôle du microenvironnement cellulaire (type organe sur puce). L'entreprise applique ses technologies notamment pour le développement de modèles 3D de foie, peau et tissus adipeux vascularisés.

Dans le cadre de sa présentation au groupe d'experts, Cherry Biotech a dressé 4 groupes de constats relatifs aux scénarii d'adoption possibles et de régulations futures des nouvelles technologies type organe sur puce. Une attention particulière a été donnée aux applications portant sur le foie. Notre vision basée sur ces 4 groupes de constats, engendre deux implications majeures, aboutissant à une proposition de stratégie.

Constats

Les 4 constats dressés reflètent :

1. Un environnement technologique complexe et diversifié (atomisation de l'offre, niveau de maturité technologique faible, pas de protection intellectuelle forte, aucune technologie nettement supérieure) ;
2. Des freins à l'adoption par les utilisateurs (promesses non tenues, nécessité d'intégration dans les protocoles d'analyses déjà existants, exigence de répétabilité et reproductibilité) ;
3. L'absence de consensus sur ce que doit être un organe sur puce (définition, niveau de complexité minimum requis, conditions de cultures) ;
4. L'absence de critère de validation (quelle méthode de référence utilisée ?, quels marqueurs biologiques utilisés ?, quelles molécules de référence ?).

Implications

Ces 4 groupes de constats engendrent notamment deux implications majeures :

1. La nécessité de statuer sur les définitions afin d'encadrer ce que doit-être et ne pas être un organe sur puce ;
2. La nécessité d'éditer des recommandations spécifiques de bon usage par applications ;

Stratégie

En se basant sur le fait que les organes-sur-puce (combinés aux méthodes *in silico*) pourraient remplacer à terme l'expérimentation animale pour le développement des médicaments et leur évaluation thérapeutique avant administration au patient (médecine personnalisée), une stratégie est proposée visant à encadrer efficacement ces nouvelles méthodes :

1. Faire des suivis de projets organes-sur-puce (en tant qu'observateurs indépendants) en cours de développement pour connaître l'état de l'art des problématiques, des verrous, des résultats et potentiels de ces technologies ;
2. Renforcer, lorsque cela est possible, la nécessité de présenter (dans le prérequis préclinique réglementaire) une méthode alternative en parallèle des méthodes classiques pour collecter des données comparatives sur le long terme ;
3. Coopérer avec les agences nationales de l'UE (sur la base du volontariat) et l'agence Européenne pour rassembler les résultats sous forme de base de données structurées (répertoire uniquement disponible aux agences réglementaires ?).

1.2. Organes sur puce : Analyse critique des données issues de la littérature

- Restitution

A tour de rôle, chaque expert a fait une restitution d'analyse critique des articles attribués.

Rappelons en guise d'introduction que la toxicité d'origine hépatique est parmi celles qui conduisent le plus souvent à l'arrêt du développement de molécules au stade non clinique ou clinique, voire même après commercialisation, d'où l'importance d'un focus sur cet organe.

Les modèles *in vitro*, faisant appel aux microsomes hépatiques ou aux hépatocytes primaires, sont d'un réel intérêt dans l'évaluation de l'hépatotoxicité. Les hépatocytes primaires sont largement utilisés au stade préclinique en raison de leur capacité métabolique démontrée. Cependant, l'utilisation de ces techniques présente des limites liées à leur accessibilité, aux variabilités en fonction des donneurs et à la différenciation des hépatocytes primaires qui rendent la reproductibilité discutable. Les lignées cellulaires hépatiques immortelles peuvent surmonter ces difficultés, mais leur faible capacité métabolique limite leur utilisation dans l'évaluation de l'hépatotoxicité et des interactions médicamenteuses. D'où le recours à des technologies innovantes d'organes sur puces pour améliorer l'évaluation de la toxicité hépatique.

De l'analyse des données de la littérature, il ressort les conclusions suivantes :

- Constat

En préambule, il faut rappeler qu'avant le passage chez l'Homme, les autorités réglementaires (FDA, EMA...) exigent généralement des études de sécurité des nouveaux médicaments à la fois chez une espèce rongeur et dans un modèle animal non rongeur. Une analyse de 150 médicaments qui ont causé des effets indésirables chez l'Homme montre que les tests réglementaires chez les rats et les chiens prédisent seulement 71% des toxicités chez l'homme. Si les toxicités gastro-intestinales, hématologiques, et cardio-vasculaires sont généralement bien détectées, la capacité de prévoir des toxicités hépatiques est plus problématique. Cela concerne notamment les réponses idiosyncrasiques rares qui se produisent dans les cohortes de patients ou après la commercialisation.

Des auteurs appliquent la technologie micro-ingénierie « Organs-on-Chips » pour concevoir un modèle de puce hépatique rat, chien et humain contenant des hépatocytes primaires spécifiques aux espèces, en interface avec des cellules endothéliales sinusoides hépatiques, avec ou sans cellules Kupffer et des cellules stellaires hépatiques, cultivés sous flux de liquide physiologique.

La puce hépatique a détecté divers phénotypes de toxicité hépatique, y compris, la stéatose, la cholestase et la fibrose, ainsi que des toxicités propres aux espèces. Une puce hépatique multi-spécifique peut fournir une plate-forme utile pour la prédiction de la toxicité hépatique et éclairer la pertinence humaine des toxicités hépatiques détectées dans les études sur les animaux afin de mieux déterminer l'innocuité et le risque humain [Jang et al., 2019].

Des auteurs [Deng et al, 2019] rapportent que la culture tridimensionnelle (3D), la co-culture avec des cellules endothéliales et des fibroblastes, l'introduction du flux sanguin, et des cellules de modelage dans un arrangement spatial ordonné, créent un microenvironnement physiologiquement biomimétique, permettant d'améliorer la fonction des cellules originales *in vitro* en favorisant l'homéostasie, le métabolisme, la croissance, et la réparation tissulaire.

Ainsi, les auteurs ont conçu et étudié un modèle de foie-sinusoïde-sur-puce 3D (LSOC), qui incorpore quatre types de lignées cellulaires immortelles (HepG2, LX-2, EAhy926, et U937), des flux sanguins artificiels du foie, et de bile, pour explorer l'hépatotoxicité du paracétamol et tester les interactions suivantes : « paracétamol + rifampicine », « paracétamol + oméprazole » et « paracétamol + ciprofloxacine ». La sécrétion d'albumine, d'urée, et l'activité métabolique sont augmentées dans ce modèle par rapport à d'autres modèles *in vitro* plus simplistes. Les effets d'inhibition ou d'induction sont aussi majorés rendant le test plus sensible ; les TC₅₀ (concentration cellulaire toxique à 50%) sont plus faibles avec le modèle ; les variations d'hépatotoxicité dans le modèle sur puce sont de : -17.15% (paracétamol + rifampicine), 14.88% (paracétamol + oméprazole), et -19.74% (paracétamol + ciprofloxacine), alors que les résultats avec le modèle d'hépatocytes primaires traditionnels ("gold standard") sont de : -13.22%, 13.51%, et -15.81% respectivement (à noter qu'aucun de ces phénomènes n'est observé sur une culture simple d'HepG2). Les résultats montrent une meilleure sensibilité pour le modèle de foie-sinusoïde-sur-puce "3D" qui incorpore ces 4 types de lignées cellulaires hépatiques, et ce via un maintien du phénotype et des fonctions d'hépatocyte jouant un rôle essentiel dans l'établissement des communications de matrice cellulaire du foie que les modèles classiques.

Des auteurs [Skardal et al, 2012] ont comparé différentes matrices extracellulaires (ECM) combinées avec des hydrogels de collagène de type 1, d'acide hyaluronique (HA), ou d'HA conjugué avec de l'héparine (HP). Les hépatocytes primaires humains sont cultivés en sandwich dans les hydrogels pendant 4 semaines. Les auteurs concluent que l'HA et l'HP permettent une meilleure fonctionnalité des hépatocytes, évaluée par la synthèse d'albumine, d'urée et d'activité métabolique.

Liu et al, [2017] ont utilisé des hépatocytes primaires de rats, frais, déposés sur une puce, constituée de fibres et de microfluides. Cette étude a été réalisée sur une durée de 15 jours pour évaluer la testostérone et le tolbutamide. Des valeurs de clairance de tolbutamide et de la testostérone sont respectivement de 1,98 et 0,43 ml/min/kg, montrant une bonne correspondance *in vitro/in vivo*. Un débit de 50 µL/min fournit le microenvironnement optimal pour maintenir des taux élevés de synthèse d'albumine et d'urée, des activités enzymatiques (CYP3A1 et CYP2C11) et de niveaux d'expression des gènes spécifiques du foie dans les sphéroïdes d'hépatocytes.

Jang et al, [2015] ont développé un système « Biochip OrganoPlate™ (MIMETAS) » fluide (sans pompe), avec un contact indirect des hépatocytes avec le flux (Cellules HepG2 dans Matrigel™). Ils ont procédé à une comparaison du modèle structure 3D statique et culture 2D. L'utilisation de la puce avec fluide permet de se rapprocher de la physiologie, sur la base de différents critères :

- morphologie : formation de canalicules biliaires pour puce uniquement
- production de LDH en fonction du temps : 2D >> 3D = puce
- production d'albumine : puce (10-24 pg/jour/cellule) >> 3D > 2D. Les niveaux sont proches des valeurs physiologiques (17.8 pg/jour/cellule).
- activité CYP450 (induction du CYP1A) : puce >> 3D = 2D
- production d'urée : puce >> 3D > 2D. Les niveaux sont proches des valeurs physiologiques (120-190 pg/jour/cellule) [Bhatia et al, 1999].
- sensibilité à la toxicité du paracétamol : puce > 3D > 2D.

Les auteurs concluent à une supériorité de la puce par rapport aux autres systèmes étudiés, et également par rapport à des résultats publiés sur des systèmes de puce concurrents, en tous cas pour certains critères.

Kostadinova R. et al. [2013], ont développé un modèle utilisant des cellules cultivées sur un échafaudage 3D avec une composition préservée d'hépatocytes, de cellules stellaires, de Kupffer et endothéliales. Ce système maintient la fonction hépatique jusqu'à 3 mois, attesté par la production d'albumine, de fibrinogène, de transferrine et d'urée. De plus, ces co-cultures hépatiques 3D maintiennent l'inductibilité du cytochrome P450, en formant des structures semblables aux canaux biliaires et répondant aux stimuli inflammatoires. Le modèle développé a été testé avec différents principes actifs hépatotoxiques : fénofibrate (hypocholestérolémiant), tioglitazone et pioglitazone (antidiabétiques) et acétaminophène (N-acetyl-p-aminophénol APAP). Les résultats de cette étude montrent que la toxicité hépatique induite par les médicaments, observée *in vivo*, est similaire à celle retrouvée avec ce modèle.

Un modèle 3D de tissu hépatique vascularisé (cellules HepG2/C3A (GelMA)) avec un hydrogel de méthacryloyle de gélatine via une technique de bio-impression à l'agarose a été développé [Massa et al., 2017]. Des micro-canaux reproductibles de 100 à 1000 µm de diamètre ont été créés. Des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) ont étéensemencées dans le micro-canal, pour obtenir un tissu hépatique vascularisé. Le modèle développé a été testé avec l'acétaminophène (APAP). L'APAP a été perfusé dans la construction de la couche HUVEC pendant 48 heures. Cette barrière a retardé le passage des médicaments du canal à l'échafaudage d'hydrogel et a protégé les cellules HepG2/C3A de la toxicité causée par le traitement médicamenteux, ce qui montre que la couche endothéliale artificielle joue un rôle crucial dans le processus de passage des médicaments. Les auteurs en concluent que ce modèle vascularisé bio-imprimé permet d'obtenir une plate-forme "foie sur puce" plus réaliste, réduisant ainsi l'écart entre les modèles de test de médicaments *in vitro* et *in vivo*.

Un modèle visant à utiliser des hépatocytes primaires humains (Hu8150) et des cellules de Kupffer (HK8160) congelés dans un rapport 10/1 en présence d'un milieu minimum essentiel de Eagle modifié pendant 48 heures a permis de fournir des marqueurs incluant des métabolites réactifs potentiels, des acides biliaires endogènes, des protéines excrétées, et des cytokines permettant de prédire précocement une toxicité hépatique induite par le diclofénac [Sarkar et al. 2017].

A partir d'hépatocytes primaires humains congelés provenant de 5 donneurs différents enrichis d'un milieu E de William sur un ensemencement de 6 jours, des auteurs [Tsamandouras et al., 2017] ont effectué des simulations stochastiques avec un modèle PBPK qui a permis de prédire avec succès les profils de concentrations de la lidocaïne en fonction du temps et la variabilité en termes de population. Les valeurs de clairance annoncées, à partir de ce système hépatique microphysiologique, ont été corrélées avec celles observées *in vivo*. Cependant les auteurs notent que les résultats générés dans de tels systèmes sont fonction des caractéristiques du système (nombre de cellules, volume moyen, composition, ...) et des paramètres biologiques intrinsèques (clairance, ...).

Des auteurs ont réalisé des sphéroïdes de cellules humaines HepG2/C3A encapsulées dans un hydrogel en gélatine méthacryloyl (GelMA). Le milieu de culture associé est le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) avec 10% FBS incubé à 37 °C avec 5% CO₂, renouvelé toutes les 48 heures et un débit du flux 200 µL h⁻¹. Les temps de prélèvements pour analyse sont : 1, 7, 15, 21 et 30 jours. La sécrétion d'albumine, d'alpha-1 antitrypsine, de transferrine, de céruloplasmine et des marqueurs hépatiques (cytokératine 18, MRP2, protéine canaliculaire biliaire) ont été suivis. L'activité métabolique baisse de 63 ± 2% à J6 par rapport à J0 pour les cultures traitées au paracétamol alors qu'elle augmente de 78 ± 4% dans le groupe contrôle ; l'expression de MRP2; la production d'albumine, d'A1AT, de transferrine, et de céruloplasmine; l'apoptose des HepG2 décroissent dans le groupe traité. Les résultats obtenus sont relativement comparables à ceux publiés chez l'animal [Bhise et al., 2016].

- Avantages

Les modèles animaux sont parfois inadéquats pour prédire la sécurité des nouveaux médicaments chez l'homme. Il est possible d'avoir recours aux technologies de modèles tridimensionnels (3D) qui imitent

mieux la biologie humaine complexe que les modèles bidimensionnels (2D) en raison de leurs interactions cellulaires accrues et de l'amélioration des fonctions cellulaires via l'introduction de stimuli mécanique et l'intégration de vaisseaux dans les constructions tissulaires assurant le transport de nutriments, d'oxygène et de médicaments. L'inclusion de matrices cellulaires pour la culture des hépatocytes primaires assurent une viabilité accrue des cellules dans la structure 3D.

Le modèle 3D de foie vascularisé est un système prometteur pour tester la toxicité des médicaments en gardant à l'esprit que le défi n'est pas de développer des modèles fonctionnels complexes mais de créer des modèles exploitables complexes.

La technologie d'organes sur puce devrait permettre d'avoir accès à un traitement individualisé en utilisant ses propres cellules pour tester les médicaments : c'est le principe de la médecine personnalisée.

- Limites

En dehors du fait qu'il existe peu de données comparant les technologies d'organes sur puces avec celles qui sont issues de l'*in vivo/in vitro* dans des conditions identiques, la comparaison aux valeurs biologiques pour les différents critères de fonctionnalité reste une donnée manquante.

L'analyse des données de la littérature montre que les conditions expérimentales sont différentes d'une étude à l'autre alors que les paramètres mesurés en dépendent et peuvent évoluer dans le temps.

- **Discussion / échanges**

Le groupe de travail a apprécié la présentation de Cherry Biotech qui était d'une grande qualité. L'approche utilisée dans cet échange était très pragmatique et transparente.

Encore une fois, la question du socle commun a été évoquée dans le domaine de la standardisation des méthodes, dans l'optique de contrôler des paramètres de reproductibilité et la comparabilité des résultats des différentes technologies.

Il semble qu'il existe encore beaucoup d'investigations à entreprendre pour arriver à une maturité technologique, visant à comparer ces technologies innovantes à celles des méthodes classiques *in vitro* ou *in vivo*. Cette démarche consistera à verrouiller une technologie clé tout en la valorisant pour aboutir à une notion de « Gold standard » en sus d'un statut réglementaire.

L'absence de consensus d'une définition d'organes sur puces est aussi un frein empêchant de statuer sur des normes de complexité minimale. La qualification du modèle requiert le concours de plusieurs acteurs tant à l'échelle nationale qu'europpéenne : parties prenantes, autorités sanitaires et réglementaires, experts etc.

Le constat montre qu'il existe plusieurs données retraçant la problématique générale des technologies d'organes sur puces avec un focus sur le foie, ce qui a justifié le choix cet organe cible.

Les technologies d'analyse à haut débit, l'automatisation de ces modèles ainsi que l'amélioration des matériaux des dispositifs offrent des perspectives intéressantes pour répondre aux défis de demain comme le criblage à haut débit, la médecine personnalisée, le traitement des maladies rares.

Conclusions du CSP

Il s'agit de poursuivre les travaux qui ont été initiés en portant nos efforts sur la standardisation via des critères de validation et un consensus sur la qualification d'un modèle.

Question posée : Elaborer une doctrine d'évaluation des technologies d'organes sur puces dans le processus de développement d'un candidat médicament ?

Votes

Nombre de votants	5/5
Nombre d'avis favorables	5/5
Nombre d'avis défavorables	0/5
Nombre d'abstention	0/5

Explication des votes

Avis majoritaires	Oui
Avis minoritaires	Non

Conclusions

L'avis général s'inscrit dans le cadre d'une continuité des travaux et d'évolution dans la réflexion autour de la technologie d'organes sur puces considérée d'essor grandissant dans l'alternative à l'expérimentation animale.

Références documentaires

A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids, N Bhise et al, Biofabrication, 2016, 8, 014101

A cell lines derived microfluidic liver model for investigation of hepatotoxicity induced by drug-drug interaction, J Deng et al, Biomicrofluidics, 2019, 13, 024101

Integrated Assessment of Diclofenac Biotransformation, Pharmacokinetics, and Omics-Based Toxicity in a Three-Dimensional Human Liver-Immunocompetent Coculture System, U Sarkar et al, Drug Metab Dispos, 2017, 45, 855–866

Quantitative Assessment of Population Variability in Hepatic Drug Metabolism Using a Perfused Three-Dimensional Human Liver Microphysiological System, N. Tsamandouras et al, J Pharmacol Exp Ther, 2017, 360, 95–105

Primary Hepatocytes Cultured on a Fiber-Embedded PDMS Chip to Study Drug Metabolism, Y Liu et al, Polymers 2017, 9, 215

Utilization of a model hepatotoxic compound, diglycolic acid, to evaluate liver organ-on-chip performance and in vitro to in vivo concordance. Food and Chemical Toxicology 146, 1-12

Organ-on-a-chip: A new paradigm for drug development. Trends in Pharmaceutical Sciences 42, N°2. 119-133.

Tissue specific synthetic ECM hydrogels for 3-D in vitro maintenance of hepatocyte function. Skardal et al, Biomaterials, 2021, 33 (18), 4565–4575.

On-chip three-dimensional cell culture in phase guides improves hepatocyte functions *in vitro*. Jang et al, Biomicrofluidic 2015, 3, 34113

A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. Kostadinova, et al, Toxicol. Appl. Pharm. 2013, 1, 1–16

Bioprinted 3D vascularized tissue model for drug toxicity analysis. Massa et al. Biomicrofluidics 2017, 4, 44109.

Reproducing human and cross-species drug toxicities using a liver-chip. Jang et al. Sci. Transl. Med. 2019, 11.

A cell lines derived microfluidic liver model for investigation of hepatotoxicity induced by drug-drug interaction. Deng et al, Biomicrofluidic 2019, 2, 24101

Organs-on-chips for the pharmaceutical development process: design perspectives and implementations Christoffersson, 2018, Linköping University, Department of Physics, chemistry and biology, biotechnology.

Organs-on-Chips in Clinical Pharmacology: Putting the Patient Into the Center of Treatment Selection and Drug Development. Peck et al, Clin Pharmacol Ther, 2020, 107(1): 181-185.

S. N. Bhatia, U. J. Balis, M. L. Yarmush, and M. Toner, FASEB J 13(14), 1883 (1999)