



Advies aan CCD

B

Datum 27 november 2020
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202011187

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2h
Project: Farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel.
Aanvraagnummer: AVD202011187
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	<p>- In bijlage dierproeven 2 vermeldt u niet welk geslacht u wilt gebruiken voor de experimenten. Kunt u dit alsnog toevoegen?</p> <p>5.2 lid1</p> <p>- U heeft alle documenten in één PDF document naar ons verzonden. Kunt u voortaan aparte documenten sturen voor:</p> <ul style="list-style-type: none">- projectvoorstel- NTS- bijlage dierproeven (meerdere bijlagen mogen in één document, mag ook los)- aanvraagformulier <p>- In uw aanvraagformulier heeft u aangegeven dat uw project zal lopen van 01-01-2021 - 31-12-2026. Dit is een jaar langer dan de wettelijke termijn. Indien uw aanvraag vergund wordt, zal dit zijn tot 31-12-2025.</p> <p>Vragen NTS:</p>
--------	--

Overzicht van opmerkingen bij AdviesNotaCCD_1 - 5.1 lid2e pdf

Pagina: 1

-
- 5.2 lid1 5.1 lid2e Datum: 4-12-2020 15:34:08 +01'00'

 - 5.2 lid1 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 4-12-2020 15:42:03 +01'00'

 - 5.2 lid1 Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 4-12-2020 15:44:05 +01'00'
De specifieke HEPs dienen per bijlage benoemd te worden 5.2 lid1

 - 5.2 lid1 Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 4-12-2020 15:36:17 +01'00'

 - 5.2 lid1 Nummer: 5 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 4-12-2020 15:50:58 +01'00'

5.2 lid1



Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)		1.200	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)		1.800	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	ziektemodellen van neurologische aandoeningen	300	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	ziektemodellen van neurologische aandoeningen	450	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Pagina: 2

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 4-12-2020 15:58:28 +01'00'
5.2 lid1

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 4-12-2020 15:57:27 +01'00'
Bij 3.5 moet het ongereif ber diersoort worden benoemd, is nu over het totaal.

Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 4-12-2020 15:59:28 +01'00'
5.2 lid1

Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren

Citaat: Dieren worden voor aanvang van het experiment standaard gehuisvest volgens de richtlijnen 2010/63/EU. In bijzondere gevallen, waar bijvoorbeeld gevochten wordt binnen een kooi, kan ervoor gekozen worden om de dieren in kleinere groepen of individueel te huisvesten. Na de operatie moeten de dieren individueel gehuisvest worden om beschadigingen van de operatiewond, probe(s) en/of katheter en/of canule, en daardoor uitval uit het experiment, te vermijden. Ook tijdens de microdialyse moeten de dieren alleen zitten. Bij veel experimenten vindt de microdialyse op de dag na de operatie (met overnacht herstel) plaats. In deze gevallen duurt de solitaire huisvesting doorgaans tussen de 24 en 36 uur (afhankelijk van het individuele tijdstip van operatie en de duur van het microdialyse-experiment. In de experimentele kooien kunnen de dieren elkaar goed horen, zien en ruiken. Bij experimenten waar de microdialyse niet op de eerste of tweede dag na de operatie plaatsvindt (bijv. met (sub)chronische doseringen) worden de dieren na de operatie zoveel mogelijk gehuisvest in de eerder genoemde speciale kooien met een tussenwand, waarbij de dieren maximaal interactie kunnen hebben met uitzondering van direct fysiek contact. In ieder geval worden kooien met individueel gehuisveste dieren zodanig geplaatst dat de dieren elkaar kunnen horen, zien en ruiken.

3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen

Zie 3.4.4.1

Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst

3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen

Citaat: Voor pijn door de operatie, zie bij bijlage 1.3.1.

Voor de beschreven ziektemodellen is het niet gebruikelijk om extra pijnstilling te gebruiken. Bij ernstig ongerief (wat zoals in Tabel 1 en bij K. beschreven wordt bij bepaalde combinaties van diermodellen en experimentele opzet kan optreden) is bij overschrijding van de vooraf bepaalde criteria voor de symptomen de toepassing van een humaan eindpunt geïndiceerd.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen

Muizen (*Mus musculus*) Wordt niet benoemd.

Ratten (*Rattus norvegicus*) wordt niet benoemd.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaten uit het DEC advies:</p> <p>C10 (huisvesting): De dieren worden met enkele uitzonderingen gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU-richtlijn. In bepaalde gevallen wordt hiervan afgeweken (bijv. solitaire huisvesting van dieren die een microdialyse-canule geplaatst hebben gekregen of verblijf in metabole kooi in geval excreta moeten worden verzameld). Indien mogelijk worden dieren dan in kooien geplaatst met een schotje ertussen, zodat wel deels contact mogelijk is (geurcontact, geluidscontact en warmtecontact door tegen de scheidingswand aan te liggen). Afwijkingen worden afdoende beargumenteerd in de aanvraag en zullen nader worden onderbouwd in het werkprotocol en afgestemd met de IvD.</p> <p>C11 (ongerief): Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De handelingen die verricht worden aan de dieren bestaan in de meeste gevallen uit het toedienen van een stof via één of meer bekende toedieningsroutes en vervolgens het afnemen van een aantal bloedmonsters ter bepaling van de (resterende) concentratie van die stof in de circulatie. Er is per handeling vaak licht ongerief (in overeenstemming met Richtlijn 2010/63/EU bijlage VIII). De huisvestingscondities zijn daarbij soms afwijkend van normaal (zie vraag 10) wanneer urine en feces opgevangen moeten worden, of wanneer dieren die geïnstrumenteerd zijn tijdelijk alleen gehuisvest moeten worden. Doordat in een aantal experimenten ook een microdialyse-probe moet worden geïmplanteerd onder anesthesie is het cumulatieve ongerief matig. De DEC heeft in vraag 2 haar twijfels geuit over het ongerief met betrekking tot voedseldeprivatie. De aanvrager heeft hierop de maximale duur verkort.</p> <p>C13 (HEPs): De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De humane eindpunten zijn goed gedefinieerd, zoals het tijdens de operatie niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, of sterke bloedingen tijdens een operatie en nadien het loskomen van probe, katheter of canule (tevens wetenschappelijk eindpunt); en de algemene afnemende condities. De kans dat dieren een humaan eindpunt bereiken wordt ingeschat als 0-5%. De DEC acht dit realistisch omdat het standaard-technieken betreft waarmee de aanvrager veel ervaring heeft.</p> <p>C18 (geslachten): Deze experimenten zullen zowel in mannelijke als</p>
-------------------	--

vrouwelijke dieren uitgevoerd worden. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de klant het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide geslachten benadrukt. Desondanks zal het merendeel van de gebruikte dieren nog steeds mannelijk zijn, omdat het voor de klant belangrijk is om de vergelijkbaarheid met eventueel voorafgaand uitgevoerde of opvolgende in-vivo-studies veilig te stellen. De klant zal in dat geval moeten aangeven dat een specifiek geslacht passender is in het totale ontwikkelingstraject.

C19 (doden): Dieren worden gedood in het kader van de proef vanwege het verkrijgen van bloed/weefsels voor bepaling van concentraties teststof en/of metabolieten. Dodingsmethoden zijn in overeenstemming met bijlage IV van de richtlijn. Wanneer geen stofconcentraties in weefsels bepaald moeten worden, zullen honden niet gedood worden maar kunnen worden hergebruikt.

Ethische afweging van de DEC:

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is: weegt het belang van de farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse ten behoeve van selectie of de-selectie van potentiële farmaca, voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel voor de mens, op tegen de aantasting van de integriteit en welzijn van de maximaal 3.750 proefdieren (muizen en ratten)?

2. De weging van de belangen door de DEC is als volgt.

Voor de grote aantallen patiënten (ook de patiënten van de toekomst) is het van groot belang dat de zoektocht naar medicijnen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel doorgaat. Mogelijk wordt hiermee veel leed voorkomen. Door de dierproeven die de CRO wil uitvoeren wordt duidelijk of een potentiële stof de bloed-hersenbarrière kan passeren, ook in het geval van bepaalde hersenziekten. Door het doen van deze voorspellende dierproeven is de blootstelling van mensen aan onwerkzame of risicovolle stoffen beperkt, en kunnen tegelijk potentiële geneesmiddelen verder worden ontwikkeld. Zonder screening en selectie staakt het ontwikkelingsproces. Dit wordt door de DEC gezien als een aanmerkelijk maatschappelijk belang.

Voor de ontwikkelaar van geneesmiddelen is het van groot belang om dierproeven te doen die voorspellend zijn voor de werking en risico's van nieuwe geneesmiddelen in de mens. De ontwikkelaar produceert met proefdiervrije technieken (chemie, in silico, celbiologie, etc.) veelal reeksen van stoffen waaruit een selectie moet worden gemaakt voor

verdere ontwikkeling. Selectie is een cruciale stap in het proces van ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. De geneesmiddelontwikkelaar besteedt die screening vaak uit aan een gespecialiseerde CRO, zoals de aanvrager.

Voor de CRO is het van belang om dergelijke opdrachten zorgvuldig en wetenschappelijk juist te kunnen uitvoeren. Dit is in verhouding een klein belang.

De proefdieren worden gebruikt als proefdier en gedood, en hebben naar verwachting maximaal matig ongerief. Vanwege het hoge aantal dieren, is ook dit een aanzienlijk belang. Van de proefdieren worden zowel de fysieke als de gedragsmatige integriteit aangetast en wordt het welzijn geschaad (met eventueel stress, pijn, ongemak). Echter, de DEC oordeelt dat het maatschappelijke en het patiëntbelang zwaarder telt.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat er een reëel maatschappelijk en patiëntbelang is om het onderzoek te kunnen uitvoeren ten behoeve van de ontwikkeling van medicijnen, en dat dit zwaarder weegt dan het belang van de dieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

- [REDACTED]
- Bij C10 (huisvesting) benoemt u het gebruik van metabole koolen om urine en feces op te vangen. 5.2 lid1 [REDACTED]
 - Bij C11 (ongerief) benoemt u niet dat 20% van de proefdieren van LAP 2 ernstig ongerief ondergaan. 5.2 lid1 [REDACTED]
 - Bij C13 (HEPs) benoemt u dat verwacht wordt dat 0-5% van de dieren een HEP zullen bereiken. 5.2 lid1 [REDACTED]
- [REDACTED]
- Bij C18 (geslachten) Beschrijft u dat de [REDACTED] in sommige gevallen zich zal willen beperken tot het gebruik van één geslacht. 5.2 lid1 [REDACTED]
 - Bij C19 (doding) beschrijft u: Wanneer geen stofconcentraties in weefsels bepaald moeten worden, zullen honden niet gedood worden maar kunnen worden hergebruikt. 5.2 lid1 [REDACTED]

T	Nummer: 1 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:34:37 +01'00'
T	Nummer: 2 5.1 lid2h	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 15:59:38 +01'00'
T	Nummer: 3 5.1 lid2h	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:01:04 +01'00'
T	Nummer: 4 5.1 lid2h	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:03:09 +01'00'
T	Nummer: 5 5.1 lid2h	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:04:21 +01'00'
T	Nummer: 6 5.1 lid2h	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:04:42 +01'00'
T	Nummer: 7 5.1 lid2h	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:05:49 +01'00'
T	Nummer: 8 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:09:24 +01'00'
T	Nummer: 9 5.1 lid2h	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:10:14 +01'00'
T	5.1 lid2h	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:12:24 +01'00'
	5.1 lid2h			
	5.1 lid2h			

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	Citaat: (1...) Het directe doel is om met behulp van de microdialysetechniek zowel kwantitatief als kwalitatief de aanwezigheid, concentratie, en effecten/werkzaamheid van potentiële geneesmiddelen en hun metabolieten tijdsafhankelijk op lokaal niveau in specifieke hersengebieden van ratten en muizen te bepalen. De verzamelde data worden gebruikt door onze klanten om een besluit te nemen of een potentieel nieuw geneesmiddel in de kliniek getest gaat worden of niet. Het uiteindelijke doel is om met de verkregen informatie de lokale biologische beschikbaarheid en effectiviteit van het potentiële geneesmiddel in de patiënt met grotere zekerheid te kunnen voorspellen. De fysiologische overeenkomsten tussen de hersenen van deze knaagdieren en die van de mens zijn groot, ook wat betreft de bloed-hersenbarrière, waarmee translatie naar de mens mogelijk is. (...)
-------------------------------------	--

5.2 lid1

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: Bij het onderzoek binnen de huidige projectaanvraag zijn verschillende belanghebbenden.</p> <p>De uit te voeren experimenten zijn bedoeld om voor onze klanten gegevens te genereren waarmee zij een selectie kunnen maken welke potentiële geneesmiddelen mogelijk tot verdere ontwikkeling in de klinische fase kunnen komen op basis van de farmacokinetische en farmacodynamische profielen.</p> <p>De informatie die uit deze experimenten wordt afgeleid, wordt gebruikt om geschikte kandidaatstoffen voor te selecteren en hun toedieningsroute en dosis voor verder (pre)klinisch onderzoek te bepalen. Ongeschikte kandidaatstoffen worden uitgesloten van verdere ontwikkeling. Dit zal op zijn beurt het aantal dieren verminderen (wettelijke verplichting Wod) dat in toekomstige preklinische onderzoeken (wettelijk verplichte veiligheidsstudies voor markttoelating) zal moeten worden ingezet. Zoals boven genoemd, kan het preklinisch onderzoek dat wij uitvoeren door onze klanten gebruikt worden als onderdeel voor het IND-rapport voor het potentiële geneesmiddel.</p> <p>In de klinische fase is er een ethische plicht om mensen die als proefpersoon meewerken aan klinisch onderzoek te beschermen tegen vermijdbare schade of lijden. Om die reden eisen medisch-ethische commissies solide data uit preklinisch onderzoek voordat ze een klinische proef met een experimenteel geneesmiddel toestaan. Dergelijke preklinische data kunnen in veel gevallen niet geproduceerd worden zonder gebruikmaking van dieren. Er zijn nog geen robuuste niet-dierlijke modellen die onverwachte neveneffecten van experimentele geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel kunnen voorspellen. De Europese richtlijnen verplichten daarom dat geneesmiddelen voor humaan gebruik worden getest in proefdieren. Onze studies dragen bij aan het belang van de klant om hun kandidaatstof als geneesmiddel aan patiënten te kunnen verstrekken. Daarmee zijn de patiënten en hun familie en omgeving de uiteindelijke belanghebbenden.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies: De aanvrager heeft een lange traditie in het uitvoeren van de beschreven studies van stoffen en screeningstudies en de bijbehorende microdialyse-technieken voor de analyse van de DMPK-studies. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager in de loop der jaren alle relevante deskundigheid en vaardigheid voor het uitvoeren van dit project heeft opgebouwd. De ervaring van de onderzoeksgroep met meer complexe kinetiekstudies staat niet alleen borg voor een goede uitvoering, maar ook voor een goede aansluiting bij (al dan niet) wettelijk verplicht vervolgonderzoek door de geneesmiddelontwikkelaar.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	---

3V's

<p>Vervanging</p>	
	<p>3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren: Citaat: Op dit moment bestaat er geen goed geïsoleerd systeem waarmee de hersenen in al hun complexiteit en samenspel met andere organen kunnen worden bestudeerd. Vervanging van deze experimenten is daardoor slechts ten dele mogelijk. Het testen van een potentieel geneesmiddel moet uiteindelijk altijd gebeuren in een intact organisme, zodat de volledige fysiologie en ook potentiële bijwerkingen kunnen worden vastgesteld. De kinetiek van farmaca wordt in grote mate bepaald door de doorbloeding van de organen, bovendien kan het zijn dat de kandidaatstof in het lichaam een secundair (off-target) effect heeft, waardoor de in vitro gemeten reactie in vivo niet plaatsvindt of wordt geremd of juist versterkt. Alleen kandidaatstoffen die in in vitro testen veelbelovend zijn, worden ingezet in dierproeven. Wel bestaan er plannen om in de nabije toekomst hersen-organoiden te gaan kweken en te testen of deze bij onze studies gebruikt kunnen worden. Dit is een interessante ontwikkeling maar nog in een vroeg stadium. Uiteindelijk hopen we hiermee een deel van de dierexperimenten te kunnen vervangen. Immers, de organoiden kunnen een goed model zijn voor de hersenen, maar (nog) niet voor het geheel van lichaam en hersenen en de bloed-hersenbarrière.</p>
	<p>3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen: Zie 3.4.4.1</p>

Verminderen	
	<p>3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren: Citaat: Allereerst wordt het aantal te gebruiken dieren verminderd doordat kandidaatstoffen voordat ze in dieren getest worden, eerst in vitro gekarakteriseerd, veelal bij de klant of bij andere CRO's. Zonder deze gegevens wordt een stof niet aan een dier toegediend. Om het gedrag van de te testen kandidaatstof (potentiële geneesmiddel) in het gekozen bemonsteringssysteem (microdialyseprobes) en de meetbaarheid met de ex vivo meetmethodes (veelal massaspectrometrie) te bepalen, wordt bij microdialyse ten behoeve van PK eerst een in vitro microdialyse doorgevoerd alvorens de kandidaatstof in dieren te testen.</p> <p>In vergelijking tot methoden waarbij op elk tijdstip dieren moeten worden getermineerd om hersenextracten te prepareren zijn er bij de microdialysetechniek veel minder dieren nodig om op verschillende tijdstippen gegevens te verzamelen over de biodistributie (PK) en/of effecten (PD) van een kandidaatstof. Als PK en PD binnen één studie gecombineerd gemeten kunnen worden (niet altijd mogelijk vanwege bijv. verschillende probe-eigenschappen, of niet wenselijk vanwege bijv. eerst dosisbepaling), vermindert het aantal proefdieren dat nodig is in de preklinische fase nog sterker. Deze strategie biedt tevens het voordeel dat de aan elkaar verbonden data (uit hetzelfde dier) betere informatie leveren dan wanneer de data uit verschillende dieren zouden worden verzameld. Door verder ontwikkeling van de post mortem offline analysemethodes kunnen steeds meer analyten per monster gemeten worden, waardoor het aantal benodigde dieren verder vermindert. Ook zijn de operatietechnieken verder ontwikkeld waardoor meer probes per dier geïmplantéerd kunnen worden.</p> <p>Bij de opzet van elke studie worden de groepen en groepsgroottes, te bemonsteren hersengebieden en eventuele andere monsters, kandidaatstofconcentraties en doseringsschema's zorgvuldig gekozen om uit zo min mogelijk dieren alle benodigde informatie te verkrijgen. Door in het experimenteel ontwerp randomisatie, pilotgroepen en verspringende administraties toe te passen, is het vaak mogelijk om eventuele uitval op te vangen zonder dat we monsters missen voor bepaalde tijdstippen. Waar mogelijk wordt bij studies met meerdere kandidaatstoffen hetzelfde vehikel voor alle kandidaatstoffen gebruikt waardoor het aantal groepen gereduceerd wordt.</p>
	<p>3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen: Zie 3.4.4.1</p>

Verfijnen	
	<p>3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren: Citaat: Door een diermodel te gebruiken dat aansluit bij voorgaande en geplande studies met dezelfde kandidaatstof en bij de eisen van de wetgever aan onderzoek aan potentiële geneesmiddelen, en natuurlijk de mogelijkheid biedt om relevante parameters voor de hersenfysiologie van de mens te meten wordt per studie dat diermodel gekozen dat het meest verfijnd antwoord kan geven op de onderzoeksvraag. Het onderzoek in deze aanvraag is gericht op geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel. Aangezien deze ziekten de bloed-hersenbarrière kunnen aantasten komen in bepaalde gevallen de meest relevante data uit transgene of chemisch geïnduceerde diermodellen voor deze ziekten (zie bijlage 1.3.2).</p> <p>Microdialyse is ook een verfijnde methode omdat na de implantatie van de probes herhaalde monsters uit een anderszins slecht bereikbaar orgaan als de hersenen genomen kunnen worden zonder het dier te storen. Gedurende het hele experiment worden de dieren gemonitord op tekenen van ongerief. Alle handelingen aan de dieren, waaronder operaties, hanteren, monitoren, monsterafname, en termineren worden volgens vaststaande protocollen uitgevoerd door bevoegde en goed getrainde medewerkers.</p>
	<p>3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen: Citaat: Zie bijlage 1.3.1 voor algemene overwegingen over vervanging, vermindering en verfijning binnen deze aanvraag.</p> <p>Specifiek voor de studies in deze bijlage is dat er eerst zowel onderzoek naar in vitro eigenschappen gedaan moet zijn als in vivo farmacokinetiek en farmacodynamiek in gezonde dieren (bijv. in studies uit bijlage 1.3.1), alvorens ziektemodellen ingezet worden.</p> <p>Het onderzoek in deze aanvraag is gericht op geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel. Aangezien deze ziekten bijvoorbeeld de bloed-hersenbarrière kunnen aantasten of de werkzaamheid van een kandidaatstof alleen vastgesteld in een ziek systeem vastgesteld kan worden, zijn transgene of chemisch geïnduceerde diermodellen voor deze ziekten soms het meest verfijnde model om de verdeling en ook de werkzaamheid van potentiële geneesmiddelen te onderzoeken.</p> <p>Aangezien bij deze ziektemodellen intrinsiek ongerief op kan treden, analoog aan de symptomen bij patiënten met dezelfde ziekte, wordt extra gelet op tekenen van ongerief bij de dieren en waar nodig extra verzorging gegeven. Per ziektemodel is (of wordt) er een interne scorelijst/beslisboom opgesteld in samenspraak met de IvD en waar nodig ondersteund door experts die bekend zijn met het model.</p>

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren	HEP: 0-5%	Citaat: Tijdens de operatie: bij niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, of sterke bloedingen wordt een humaan eindpunt toegepast. Na de operatie en tijdens het experiment: het loskomen van probes, katheter of canule (tevens wetenschappelijk eindpunt); convulsies; het loskomen van hechtingen gepaard gaand met grote verwondingen; algehele slechte conditie van het dier na operatie (op basis van parameters zoals gewicht (algemeen meer dan 15% gewichtsverlies, vlak na de operatie 20%), vacht, oogkleur, huidskleur en lichaamstemperatuur en beschreven in de interne SOP (Animal discomfort and humane endpoints).
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	Ongerief: 100,0% Matig	
Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	Ongerief: 100,0% Matig	
3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen	HEP: 5-10%	Citaat: Zie bij bijlage 1.3.1 voor de algemene humane eindpunten binnen deze aanvraag. Voor de verschillende ziektemodellen zijn additioneel aangepaste eindpunten vastgelegd in zowel de algemene SOP "animal discomfort and humane endpoints" als in modelspecifieke werkinstructies. Het is voor onze studies van belang dat de symptomen niet zo ernstig zijn dat de hele fysiologie van het dier aangetast is. Experimenten worden daarom zoveel mogelijk vroeg in het ziekteproces uitgevoerd en afgesloten.
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	Ongerief: 20,0% Ernstig 80,0% Matig	
Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	Ongerief: 20,0% Ernstig 80,0% Matig	

5 Samenvatting

5.2 lid 1



Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 4-12-2020 16:25:41 +01'00'

5.2 lid1

Het projectvoorstel bevat voldoende informatie over het belang van het onderzoek, de strategie, de 3V's, het ongerief en de humane eindpunten om tot een oordeel te kunnen komen. Het DEC-advies kan als grondslag dienen voor het besluit.

5.2 lid1

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 4-12-2020 16:21:25 +01'00'

5.2 lid1

Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 4-12-2020 16:21:56 +01'00'

5.2 lid1

Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 4-12-2020 16:21:28 +01'00'

Nummer: 5 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 4-12-2020 16:22:35 +01'00'

5.2 lid1

5.2 lid1

De verzorging is niet altijd volgens de richtlijn. 5.2 lid1

De [redacted] wil, 5.2 lid1 [redacted] in sommige gevallen één geslacht gebruiken, en zegt daarover: Deze experimenten kunnen zowel in mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd worden. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de klant het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide geslachten benadrukt.

5.2 lid1

5.2 lid1

12

17

19

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

Pagina: 15

T	Nummer: 1 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:23:26 +01'00'
T	Nummer: 2	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:22:01 +01'00'
T	Nummer: 3 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:21:00 +01'00'
T	4 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:14:54 +01'00'
T	Nummer: 5	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:15:39 +01'00'
T	Nummer: 6	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:15:47 +01'00'
T	Nummer: 7	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:16:27 +01'00'
T	Nummer: 8	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:16:35 +01'00'
T	Nummer: 9 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:16:51 +01'00'
T	Nummer: 10	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Sticky Note	Datum: 4-12-2020 16:17:41 +01'00'
T	Nummer: 11	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:16:51 +01'00'
T	Nummer: 12 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:17:56 +01'00'
T	Nummer: 13 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:18:19 +01'00'
T	Nummer: 14 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:18:55 +01'00'
T	Nummer: 15 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 4-12-2020 16:19:06 +01'00'
T	Nummer: 16 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Sticky Note	Datum: 4-12-2020 16:19:48 +01'00'
T	Nummer: 17 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Sticky Note	Datum: 4-12-2020 16:20:45 +01'00'
T	Nummer: 18 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Sticky Note	Datum: 4-12-2020 16:20:02 +01'00'
T	Nummer: 19 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Sticky Note	Datum: 4-12-2020 16:25:01 +01'00'

Een deel van de dieren ondergaat ernstig ongerief, **5.2 lid 1**



Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2026 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



Advies aan CCD

B

Datum 04 december 2020
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202011187

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker:
Project: Farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel.
Aanvraagnummer: AVD202011187
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	
	<ul style="list-style-type: none">- In de bijlagen dierproeven verwijst u naar een interne SOP voor het vaststellen van humane eindpunten. De specifieke humane eindpunten dienen per bijlage benoemd te worden. Bijlagen dienen een op zichzelf leesbaar geheel te vormen, verwijzingen naar een interne SOP zijn daarom niet afdoende voor de beoordeling van uw aanvraag. Kunt u concrete humane eindpunten aangeven?- In bijlage dierproeven 2 vermeldt u niet welk geslacht u wilt gebruiken voor de experimenten. Kunt u dit alsnog toevoegen?- In bijlage dierproeven 2 verwacht u 300 muizen en 450 ratten te gebruiken. Het is onnavolgbaar hoe deze aantallen berekend zijn. Kunt u dit verhelderen?- In bijlage 2 verwijst u enkele keren naar bijlage 1. De bijlages dienen op zichzelf leesbare documenten te zijn. We verzoeken u de informatie in bijlage 2 uit te breiden.- U heeft alle documenten in één PDF document naar ons verzonden. Kunt u voortaan aparte documenten sturen voor:<ul style="list-style-type: none">- projectvoorstel- NTS- bijlage dierproeven (meerdere bijlagen mogen in één document, mag ook los)- aanvraagformulier

<p>Vragen NTS:</p> <p>- Bij punt 3.2 heeft u het over "nieuwe geneesmiddel" kunt u dit veranderen in "nieuwe geneesmiddelen" of "een nieuw geneesmiddel"?</p> <p>- Kunt u de term "microdialysetechniek" in eenvoudige taal toelichten in het document?</p>				
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)		1.200	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)		1.800	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	ziektemodellen van neurologische aandoeningen	300	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	ziektemodellen van neurologische aandoeningen	450	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren

Citaat: Dieren worden voor aanvang van het experiment standaard gehuisvest volgens de richtlijnen 2010/63/EU. In bijzondere gevallen, waar bijvoorbeeld gevochten wordt binnen een kooi, kan ervoor gekozen worden om de dieren in kleinere groepen of individueel te huisvesten. Na de operatie moeten de dieren individueel gehuisvest worden om beschadigingen van de operatiewond, probe(s) en/of katheter en/of canule, en daardoor uitval uit het experiment, te vermijden. Ook tijdens de microdialyse moeten de dieren alleen zitten. Bij veel experimenten vindt de microdialyse op de dag na de operatie (met overnacht herstel) plaats. In deze gevallen duurt de solitaire huisvesting doorgaans tussen de 24 en 36 uur (afhankelijk van het individuele tijdstip van operatie en de duur van het microdialyse-experiment. In de experimentele kooien kunnen de dieren elkaar goed horen, zien en ruiken. Bij experimenten waar de microdialyse niet op de eerste of tweede dag na de operatie plaatsvindt (bijv. met (sub)chronische doseringen) worden de dieren na de operatie zoveel mogelijk gehuisvest in de eerder genoemde speciale kooien met een tussenwand, waarbij de dieren maximaal interactie kunnen hebben met uitzondering van direct fysiek contact. In ieder geval worden kooien met individueel gehuisveste dieren zodanig geplaatst dat de dieren elkaar kunnen horen, zien en ruiken.

3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen

Zie 3.4.4.1

Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst

3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen

Citaat: Voor pijn door de operatie, zie bij bijlage 1.3.1.

Voor de beschreven ziektemodellen is het niet gebruikelijk om extra pijnstilling te gebruiken. Bij ernstig ongerief (wat zoals in Tabel 1 en bij K. beschreven wordt bij bepaalde combinaties van diermodellen en experimentele opzet kan optreden) is bij overschrijding van de vooraf bepaalde criteria voor de symptomen de toepassing van een humaan eindpunt geïndiceerd.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen

Muizen (*Mus musculus*) Wordt niet benoemd.

Ratten (*Rattus norvegicus*) wordt niet benoemd.

Locatie uitvoering experimenten	<ul style="list-style-type: none">- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder.- Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	---

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaten uit het DEC advies:</p> <p>C10 (huisvesting): De dieren worden met enkele uitzonderingen gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU-richtlijn. In bepaalde gevallen wordt hiervan afgeweken (bijv. solitaire huisvesting van dieren die een microdialyse-canule geplaatst hebben gekregen of verblijf in metabole kooi in geval excreta moeten worden verzameld). Indien mogelijk worden dieren dan in kooien geplaatst met een schotje ertussen, zodat wel deels contact mogelijk is (geurcontact, geluidcontact en warmtecontact door tegen de scheidingswand aan te liggen). Afwijkingen worden afdoende beargumenteerd in de aanvraag en zullen nader worden onderbouwd in het werkprotocol en afgestemd met de IvD.</p> <p>C11 (ongerief): Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De handelingen die verricht worden aan de dieren bestaan in de meeste gevallen uit het toedienen van een stof via één of meer bekende toedieningsroutes en vervolgens het afnemen van een aantal bloedmonsters ter bepaling van de (resterende) concentratie van die stof in de circulatie. Er is per handeling vaak licht ongerief (in overeenstemming met Richtlijn 2010/63/EU bijlage VIII). De huisvestingscondities zijn daarbij soms afwijkend van normaal (zie vraag 10) wanneer urine en feces opgevangen moeten worden, of wanneer dieren die geïnstumenteed zijn tijdelijk alleen gehuisvest moeten worden. Doordat in een aantal experimenten ook een microdialyse-probe moet worden geïmplanteerd onder anesthesie is het cumulatieve ongerief matig. De DEC heeft in vraag 2 haar twijfels geuit over het ongerief met betrekking tot voedseldeprivatie. De aanvrager heeft hierop de maximale duur verkort.</p> <p>C13 (HEPs): De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De humane eindpunten zijn goed gedefinieerd, zoals het tijdens de operatie niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, of sterke bloedingen tijdens een operatie en nadien het loskomen van probe, katheter of canule (tevens wetenschappelijk eindpunt); en de algemene afnemende condities. De kans dat dieren een humaan eindpunt bereiken wordt ingeschat als 0-5%. De DEC acht dit realistisch omdat het standaard-technieken betreft waarmee de aanvrager veel ervaring heeft.</p> <p>C18 (geslachten): Deze experimenten zullen zowel in mannelijke als</p>
-------------------	---

vrouwelijke dieren uitgevoerd worden. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de klant het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide geslachten benadrukt. Desondanks zal het merendeel van de gebruikte dieren nog steeds mannelijk zijn, omdat het voor de klant belangrijk is om de vergelijkbaarheid met eventueel voorafgaand uitgevoerde of opvolgende in-vivo-studies veilig te stellen. De klant zal in dat geval moeten aangeven dat een specifiek geslacht passender is in het totale ontwikkelingstraject.

C19 (doden): Dieren worden gedood in het kader van de proef vanwege het verkrijgen van bloed/weefsels voor bepaling van concentraties teststof en/of metabolieten. Dodingsmethoden zijn in overeenstemming met bijlage IV van de richtlijn. Wanneer geen stofconcentraties in weefsels bepaald moeten worden, zullen honden niet gedood worden maar kunnen worden hergebruikt.

Ethische afweging van de DEC:

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is: weegt het belang van de farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse ten behoeve van selectie of de-selectie van potentiële farmaca, voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel voor de mens, op tegen de aantasting van de integriteit en welzijn van de maximaal 3.750 proefdieren (muizen en ratten)?

2. De weging van de belangen door de DEC is als volgt.

Voor de grote aantallen patiënten (ook de patiënten van de toekomst) is het van groot belang dat de zoektocht naar medicijnen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel doorgaat. Mogelijk wordt hiermee veel leed voorkomen. Door de dierproeven die de 5.1 lid2h uitvoeren wordt duidelijk of een potentiële stof de bloed-hersenbarrière kan passeren, ook in het geval van bepaalde hersenziekten. Door het doen van deze voorspellende dierproeven is de blootstelling van mensen aan onwerkzame of risicovolle stoffen beperkt, en kunnen tegelijk potentiële geneesmiddelen verder worden ontwikkeld. Zonder screening en selectie staakt het ontwikkelingsproces. Dit wordt door de DEC gezien als een aanmerkelijk maatschappelijk belang.

Voor de ontwikkelaar van geneesmiddelen is het van groot belang om dierproeven te doen die voorspellend zijn voor de werking en risico's van nieuwe geneesmiddelen in de mens. De ontwikkelaar produceert met proefdiervrije technieken (chemie, in silico, celbiologie, etc.) veelal reeksen van stoffen waaruit een selectie moet worden gemaakt voor

verdere ontwikkeling. Selectie is een cruciale stap in het proces van ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. De geneesmiddelontwikkelaar besteedt die screening vaak uit aan een gespecialiseerde [REDACTED] zoals de aanvrager.

Voor de [REDACTED] is het van belang om dergelijke opdrachten zorgvuldig en wetenschappelijk juist te kunnen uitvoeren. Dit is in verhouding een klein belang.

De proefdieren worden gebruikt als proefdier en gedood, en hebben naar verwachting maximaal matig ongerief. Vanwege het hoge aantal dieren, is ook dit een aanzienlijk belang. Van de proefdieren worden zowel de fysieke als de gedragsmatige integriteit aangetast en wordt het welzijn geschaad (met eventueel stress, pijn, ongemak). Echter, de DEC oordeelt dat het maatschappelijke en het patiëntbelang zwaarder telt.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat er een reëel maatschappelijk en patiëntbelang is om het onderzoek te kunnen uitvoeren ten behoeve van de ontwikkeling van medicijnen, en dat dit zwaarder weegt dan het belang van de dieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing en De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen. Bij enkele vragen is het echter niet geheel duidelijk hoe u tot uw conclusie bent gekomen, te weten:

- Bij C10 (huisvesting) benoemt u het gebruik van metabole kooien om urine en feces op te vangen. Wij hebben dit echter niet terug kunnen lezen in de aanvraag. Kunt u toelichten waar u deze informatie hebt gevonden?

- Bij C11 (ongerief) benoemt u niet dat 20% van de proefdieren van bijlage 2 ernstig ongerief ondergaan. In verband met dit ernstige ongerief is een beoordeling achteraf noodzakelijk.

- Bij C13 (HEPs) benoemt u dat verwacht wordt dat 0-5% van de dieren een HEP zullen bereiken. In DAP 2 is dat echter ingeschat als 5-10%. Tevens oordeelt u dat de HEPs goed beschreven zijn. Wij willen u er echter op attent maken dat in bijlage 3.4.4.2 wordt verwezen naar interne SOP's van de aanvrager. De HEPs dienen echter in de bijlage zelf te worden benoemd. Aangezien wij geen inzicht hebben in deze SOPs hebben wij de aanvrager verzocht om deze alsnog toe te voegen, zodat wij kunnen beoordelen of de HEP's adequaat zijn.

- Bij C18 (geslachten) Beschrijft u dat de █████ in sommige gevallen zich zal willen beperken tot het gebruik van één geslacht. Wij hadden graag in uw advies teruggelezen of u de onderbouwing hiervoor voldoende vindt.

- Bij C19 (doding) beschrijft u: Wanneer geen stofconcentraties in weefsels bepaald moeten worden, zullen honden niet gedood worden maar kunnen worden hergebruikt. Omdat er voor dit project geen honden worden gebruikt zijn wij ervan uit gegaan dat het hier gaat om een kennelijke verschrijving. Indien dit niet het gevals is vernemen wij dat graag.

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	Citaat: (...) Het directe doel is om met behulp van de microdialysetechniek zowel kwantitatief als kwalitatief de aanwezigheid, concentratie, en effecten/werkzaamheid van potentiële geneesmiddelen en hun metabolieten tijdsafhankelijk op lokaal niveau in specifieke hersengebieden van ratten en muizen te bepalen. De verzamelde data worden gebruikt door onze klanten om een besluit te nemen of een potentieel nieuw geneesmiddel in de kliniek getest gaat worden of niet. Het uiteindelijke doel is om met de verkregen informatie de lokale biologische beschikbaarheid en effectiviteit van het potentiële geneesmiddel in de patiënt met grotere zekerheid te kunnen voorspellen. De fysiologische overeenkomsten tussen de hersenen van deze knaagdieren en die van de mens zijn groot, ook wat betreft de bloed-hersenbarrière, waarmee translatie naar de mens mogelijk is. (...)
-------------------------------------	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: Bij het onderzoek binnen de huidige projectaanvraag zijn verschillende belanghebbenden.</p> <p>De uit te voeren experimenten zijn bedoeld om voor onze klanten gegevens te genereren waarmee zij een selectie kunnen maken welke potentiële geneesmiddelen mogelijk tot verdere ontwikkeling in de klinische fase kunnen komen op basis van de farmacokinetische en farmacodynamische profielen.</p> <p>De informatie die uit deze experimenten wordt afgeleid, wordt gebruikt om geschikte kandidaatstoffen voor te selecteren en hun toedieningsroute en dosis voor verder (pre)klinisch onderzoek te bepalen. Ongeschikte kandidaatstoffen worden uitgesloten van verdere ontwikkeling. Dit zal op zijn beurt het aantal dieren verminderen (wettelijke verplichting Wod) dat in toekomstige preklinische onderzoeken (wettelijk verplichte veiligheidsstudies voor markttoelating) zal moeten worden ingezet. Zoals boven genoemd, kan het preklinisch onderzoek dat wij uitvoeren door onze klanten gebruikt worden als onderdeel voor het IND-rapport voor het potentiële geneesmiddel.</p> <p>In de klinische fase is er een ethische plicht om mensen die als proefpersoon meewerken aan klinisch onderzoek te beschermen tegen vermijdbare schade of lijden. Om die reden eisen medisch-ethische commissies solide data uit preklinisch onderzoek voordat ze een klinische proef met een experimenteel geneesmiddel toestaan. Dergelijke preklinische data kunnen in veel gevallen niet geproduceerd worden zonder gebruikmaking van dieren. Er zijn nog geen robuuste niet-dierlijke modellen die onverwachte neveneffecten van experimentele geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel kunnen voorspellen. De Europese richtlijnen verplichten daarom dat geneesmiddelen voor humaan gebruik worden getest in proefdieren. Onze studies dragen bij aan het belang van de klant om hun kandidaatstof als geneesmiddel aan patiënten te kunnen verstrekken. Daarmee zijn de patiënten en hun familie en omgeving de uiteindelijke belanghebbenden.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies: De aanvrager heeft een lange traditie in het uitvoeren van de beschreven studies van stoffen en screeningstudies en de bijbehorende microdialyse-technieken voor de analyse van de DMPK-studies. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager in de loop der jaren alle relevante deskundigheid en vaardigheid voor het uitvoeren van dit project heeft opgebouwd. De ervaring van de onderzoeksgroep met meer complexe kinetiekstudies staat niet alleen borg voor een goede uitvoering, maar ook voor een goede aansluiting bij (al dan niet) wettelijk verplicht vervolgonderzoek door de geneesmiddelontwikkelaar.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	---

3V's

<p>Vervanging</p>	
	<p>3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren: Citaat: Op dit moment bestaat er geen goed geïsoleerd systeem waarmee de hersenen in al hun complexiteit en samenspel met andere organen kunnen worden bestudeerd. Vervanging van deze experimenten is daardoor slechts ten dele mogelijk. Het testen van een potentieel geneesmiddel moet uiteindelijk altijd gebeuren in een intact organisme, zodat de volledige fysiologie en ook potentiële bijwerkingen kunnen worden vastgesteld. De kinetiek van farmaca wordt in grote mate bepaald door de doorbloeding van de organen, bovendien kan het zijn dat de kandidaatstof in het lichaam een secundair (off-target) effect heeft, waardoor de in vitro gemeten reactie in vivo niet plaatsvindt of wordt geremd of juist versterkt. Alleen kandidaatstoffen die in in vitro testen veelbelovend zijn, worden ingezet in dierproeven. Wel bestaan er plannen om in de nabije toekomst hersen-organoïden te gaan kweken en te testen of deze bij onze studies gebruikt kunnen worden. Dit is een interessante ontwikkeling maar nog in een vroeg stadium. Uiteindelijk hopen we hiermee een deel van de dierexperimenten te kunnen vervangen. Immers, de organoïden kunnen een goed model zijn voor de hersenen, maar (nog) niet voor het geheel van lichaam en hersenen en de bloed-hersenbarrière.</p>
	<p>3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen: Zie 3.4.4.1</p>

Verminderen

3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe

CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren: Citaat: Allereerst wordt het aantal te gebruiken dieren verminderd doordat kandidaatstoffen voordat ze in dieren getest worden, eerst in vitro gekarakteriseerd, veelal bij de klant of bij andere **5.1 lid 2h** onder deze gegevens wordt een stof niet aan een dier toegediend. Om het gedrag van de te testen kandidaatstof (potentiële geneesmiddel) in het gekozen bemonsteringssysteem (microdialyseprobes) en de meetbaarheid met de ex vivo meetmethodes (veelal massaspectrometrie) te bepalen, wordt bij microdialyse ten behoeve van PK eerst een in vitro microdialyse doorgevoerd alvorens de kandidaatstof in dieren te testen.

In vergelijking tot methoden waarbij op elk tijdstip dieren moeten worden getermineerd om hersenextracten te prepareren zijn er bij de microdialysetechniek veel minder dieren nodig om op verschillende tijdstippen gegevens te verzamelen over de biodistributie (PK) en/of effecten (PD) van een kandidaatstof. Als PK en PD binnen één studie gecombineerd gemeten kunnen worden (niet altijd mogelijk vanwege bijv. verschillende probe-eigenschappen, of niet wenselijk vanwege bijv. eerst dosisbepaling), vermindert het aantal proefdieren dat nodig is in de preklinische fase nog sterker. Deze strategie biedt tevens het voordeel dat de aan elkaar verbonden data (uit hetzelfde dier) betere informatie leveren dan wanneer de data uit verschillende dieren zouden worden verzameld. Door verder ontwikkeling van de post mortem offline analysemethodes kunnen steeds meer analyten per monster gemeten worden, waardoor het aantal benodigde dieren verder vermindert. Ook zijn de operatietechnieken verder ontwikkeld waardoor meer probes per dier geïmplantéerd kunnen worden.

Bij de opzet van elke studie worden de groepen en groepsgroottes, te bemonsteren hersengebieden en eventuele andere monsters, kandidaatstofconcentraties en doseringsschema's zorgvuldig gekozen om uit zo min mogelijk dieren alle benodigde informatie te verkrijgen. Door in het experimenteel ontwerp randomisatie, pilotgroepen en verspringende administraties toe te passen, is het vaak mogelijk om eventuele uitval op te vangen zonder dat we monsters missen voor bepaalde tijdstippen. Waar mogelijk wordt bij studies met meerdere kandidaatstoffen hetzelfde vehikel voor alle kandidaatstoffen gebruikt waardoor het aantal groepen gereduceerd wordt.

3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen: Zie 3.4.4.1

Verfijnen

3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe

CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren: Citaat: Door een diermodel te gebruiken dat aansluit bij voorgaande en geplande studies met dezelfde kandidaatstof en bij de eisen van de wetgever aan onderzoek aan potentiële geneesmiddelen, en natuurlijk de mogelijkheid biedt om relevante parameters voor de hersenfysiologie van de mens te meten wordt per studie dat diermodel gekozen dat het meest verfijnd antwoord kan geven op de onderzoeksvraag. Het onderzoek in deze aanvraag is gericht op geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel. Aangezien deze ziekten de bloed-hersenbarrière kunnen aantasten komen in bepaalde gevallen de meest relevante data uit transgene of chemisch geïnduceerde diermodellen voor deze ziekten (zie bijlage 1.3.2).

Microdialyse is ook een verfijnde methode omdat na de implantatie van de probes herhaalde monsters uit een anderszins slecht bereikbaar orgaan als de hersenen genomen kunnen worden zonder het dier te storen. Gedurende het hele experiment worden de dieren gemonitord op tekenen van ongerief. Alle handelingen aan de dieren, waaronder operaties, hanteren, monitoren, monsterafname, en termineren worden volgens vaststaande protocollen uitgevoerd door bevoegde en goed getrainde medewerkers.

3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe

CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen: Citaat: Zie bij bijlage 1.3.1 voor algemene overwegingen over vervanging, vermindering en verfijning binnen deze aanvraag.

Specifiek voor de studies in deze bijlage is dat er eerst zowel onderzoek naar in vitro eigenschappen gedaan moet zijn als in vivo farmacokinetiek en farmacodynamiek in gezonde dieren (bijv. in studies uit bijlage 1.3.1), alvorens ziektemodellen ingezet worden.

Het onderzoek in deze aanvraag is gericht op geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel. Aangezien deze ziekten bijvoorbeeld de bloed-hersenbarrière kunnen aantasten of de werkzaamheid van een kandidaatstof alleen vastgesteld in een ziek systeem vastgesteld kan worden, zijn transgene of chemisch geïnduceerde diermodellen voor deze ziekten soms het meest verfijnde model om de verdeling en ook de werkzaamheid van potentiële geneesmiddelen te onderzoeken.

Aangezien bij deze ziektemodellen intrinsiek ongerief op kan treden, analoog aan de symptomen bij patiënten met dezelfde ziekte, wordt extra gelet op tekenen van ongerief bij de dieren en waar nodig extra verzorging gegeven. Per ziektemodel is (of wordt) er een interne scorelijst/beslisboom opgesteld in samenspraak met de IvD en waar nodig ondersteund door experts die bekend zijn met het model.

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren	HEP: 0-5%	Citaat: Tijdens de operatie: bij niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, of sterke bloedingen wordt een humaan eindpunt toegepast. Na de operatie en tijdens het experiment: het loskomen van probes, katheter of canule (tevens wetenschappelijk eindpunt); convulsies; het loskomen van hechtingen gepaard gaand met grote verwondingen; algehele slechte conditie van het dier na operatie (op basis van parameters zoals gewicht (algemeen meer dan 15% gewichtsverlies, vlak na de operatie 20%), vacht, oogkleur, huidskleur en lichaamstemperatuur en beschreven in de interne SOP (Animal discomfort and humane endpoints).
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 100,0% Matig	
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 100,0% Matig	
3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen	HEP: 5-10%	Citaat: Zie bij bijlage 1.3.1 voor de algemene humane eindpunten binnen deze aanvraag. Voor de verschillende ziektemodellen zijn additioneel aangepaste eindpunten vastgelegd in zowel de algemene SOP "animal discomfort and humane endpoints" als in modelspecifieke werkinstructies. Het is voor onze studies van belang dat de symptomen niet zo ernstig zijn dat de hele fysiologie van het dier aangetast is. Experimenten worden daarom zoveel mogelijk vroeg in het ziekteproces uitgevoerd en afgesloten.
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 20,0% Ernstig 80,0% Matig	
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 20,0% Ernstig 80,0% Matig	

5 Samenvatting

Het projectvoorstel bevat voldoende informatie over het belang van het onderzoek, de strategie, de 3V's en het ongerief om tot een oordeel te kunnen komen. Er zijn enkele onregelmatigheden in de aanvraag en het DEC-advies gevonden die opheldering vereisen.

Het betreft een **5.1 lid 2** aanvraag voor een methode om via microdialyse farmacokinetiek in de hersenen te meten.

De verzorging is niet altijd volgens de richtlijn. De DEC vindt de onderbouwing voor het afwijken van de richtlijn voldoende. Het Secretariaat **5.2 lid 1**

De aanvrager wil, op aanvraag van de klant, in sommige gevallen één geslacht gebruiken, en zegt daarover: Deze experimenten kunnen zowel in mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd worden. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de klant het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide geslachten benadrukt. Desondanks zal het merendeel van de gebruikte dieren mannelijk zijn. Het Secretariaat oordeelt dat **5.2 lid 1**

In DAP 2 wordt niet vermeld welk geslacht gebruikt zal worden. De aanvrager is verzocht dit ook in DAP 2 te vermelden.

In DAP2 wordt voor de HEPs alleen verwezen naar het gebruik van een interne SOP, hierdoor is niet toetsbaar of de HEPs adequaat zijn gefomuleerd. De aanvrager is verzocht de HEPs voor DAP2 per model concreet uit te schrijven.

In DAP 2 staan veel verwijzingen naar DAP1. De aanvrager is verzocht DAP2 aan te vullen zodat deze op zichzelf leesbaar is.

In DAP2 is niet navolgbaar hoe de aantallen dieren zijn berekend. De aanvrager is gevraagd dit toe te lichten.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

Het Secretariaat **5.2 lid 1**

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2026 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: woensdag 9 december 2020 11:33
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
Onderwerp: RE: [External]: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 02011187

Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

19

Geachte leden van de CCD,

Bedankt voor uw e-mail. We hebben de stukken aangepast en via NetFTP aangeleverd.

Met vriendelijk groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2h

5.1 lid2h

Confidentiality Notice: The information contained in this email and any attachments are confidential and may contain privileged and/or proprietary information. This email is intended for the use of the addressee only. If you are not the intended recipient, you are strictly prohibited from copying, distributing or using this email or the information contained in it. If you received this email in error, please notify the sender immediately by email or telephone, and destroy any copies, electronic, paper or otherwise.



From: info@zbo-ccd.nl
Sent: Friday, December 4, 2020 4:49 PM
To: 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2e ; 5.1 lid2h
Subject: [External]: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 02011187

18

Geachte 5.1 lid2e,

Op 05-10-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 02011187. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.


Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

- Bij punt 3.2 heeft u het over "nieuwe geneesmiddel" kunt u dit veranderen in "nieuwe geneesmiddelen" of "een nieuw geneesmiddel"?
- Kunt u de term "microdialysetechniek" in eenvoudige taal toelichten in het document?

Onduidelijkheden

- In de bijlagen dierproeven verwijst u naar een interne SOP voor het vaststellen van humane eindpunten. De specifieke humane eindpunten dienen per bijlage benoemd te worden. Bijlagen dienen een op zichzelf leesbaar geheel te vormen, verwijzingen naar een interne SOP zijn daarom niet afdoende voor de beoordeling van uw aanvraag. Kunt u concrete humane eindpunten aangeven?
- In bijlage dierproeven 2 vermeldt u niet welk geslacht u wilt gebruiken voor de experimenten. Kunt u dit alsnog toevoegen?
- In bijlage dierproeven 2 verwacht u 300 muizen en 450 ratten te gebruiken. Het is onnavolgbaar hoe deze aantallen berekend zijn. Kunt u dit verhelderen?
- In bijlage 2 verwijst u enkele keren naar bijlage 1. De bijlages dienen op zichzelf leesbare documenten te zijn. We verzoeken u de informatie in bijlage 2 uit te breiden.
- U heeft alle documenten in 1 PDF document naar ons verzonden. Kunt u voortaan aparte documenten sturen voor:
 - projectvoorstel
 - NTS
 - bijlage dierproeven (meerdere bijlagen mogen in n document, mag ook los)
 - aanvraagformulier

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Uw aanvraag wordt besproken in de vergadering van 11 december. Indien u uiterlijk 10 december de antwoorden naar ons toestuurt zullen deze worden meegenomen in onze overweging.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 5.1 lid2h <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																								
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">Naam instelling of organisatie</td> <td colspan="2">5.1 lid2e</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td colspan="2">5.1 lid2e</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>5.1 lid2h</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>5.1 lid2h</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>5.1 lid2h</td> <td>5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2">5.1 lid2h</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	5.1 lid2e		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	5.1 lid2e		KvK-nummer	5.1 lid2h		Straat en huisnummer	5.1 lid2h		Postbus			Postcode en plaats	5.1 lid2h	5.1 lid2h	IBAN	5.1 lid2h		Tenaamstelling van het rekeningnummer	5.1 lid2h	
Naam instelling of organisatie	5.1 lid2e																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	5.1 lid2e																									
KvK-nummer	5.1 lid2h																									
Straat en huisnummer	5.1 lid2h																									
Postbus																										
Postcode en plaats	5.1 lid2h	5.1 lid2h																								
IBAN	5.1 lid2h																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	5.1 lid2h																									
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">Postbus</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>5.1 lid2h</td> <td>5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2">5.1 lid2h</td> </tr> </table>	Postbus			Postcode en plaats	5.1 lid2h	5.1 lid2h	IBAN	5.1 lid2h		Tenaamstelling van het rekeningnummer	5.1 lid2h													
Postbus																										
Postcode en plaats	5.1 lid2h	5.1 lid2h																								
IBAN	5.1 lid2h																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	5.1 lid2h																									
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td style="width: 40%;">5.1 lid2e</td> <td style="width: 30%;"> <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. </td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td colspan="2">5.1 lid2e</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2">5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2">5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2">5.1 lid2e</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	5.1 lid2e		Afdeling	5.1 lid2h		Telefoonnummer	5.1 lid2h		E-mailadres	5.1 lid2e										
(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie	5.1 lid2e																									
Afdeling	5.1 lid2h																									
Telefoonnummer	5.1 lid2h																									
E-mailadres	5.1 lid2e																									
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td style="width: 40%;"></td> <td style="width: 30%;"> <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. </td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2"></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres											
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie																										
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres																										

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | |
| Afdeling | |
| Telefoonnummer | |
| E-mailadres | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 1 - 1 - 2021 |
| Einddatum | 31 - 12 - 2026 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van geneesmiddelen tegen hersenziekten met behulp van microdialyse
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------|
| Naam DEC | 5.1 lid 2h |
| Postadres | |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1662 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	5.1 lid2e
Functie	5.1 lid2e
Plaats	5.1 lid2h
Datum	- -
Handtekening	



Format Projectvoorstel dierproeven

1. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
2. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
3. Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
4. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2n
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul de titel van het project in. Farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
 - Translationeel of toegepast onderzoek
 - Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
 - Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
 - Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
 - Hoger onderwijs of opleiding
 - Forensisch onderzoek
 - Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

1. Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
2. Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
3. Geef in geval van 'hogere onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Aanleiding voor het onderzoek is het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen die ingezet kunnen worden voor de genezing of symptoombestrijding bij patiënten met een ziekte van het centraal zenuwstelsel. Veel neurologische en psychiatrische aandoeningen waaronder (maar niet beperkt tot) de ziekten van Alzheimer, Huntington en Parkinson, epilepsie, multiple sclerose, chronische pijn en zeldzame erfelijke ziekten zijn op dit moment niet of onvoldoende goed te behandelen. Het is voorsnog niet mogelijk neurodegeneratieve aandoeningen te genezen, het is alleen mogelijk de symptomen te verlichten of het ziekteproces te vertragen. Deze ziekten veroorzaken voor de patiënt en diens omgeving veel leed en hebben uiteindelijk een dodelijke afloop.

Volgens de WHO zijn wereldwijd honderden miljoenen mensen getroffen door een neurologische aandoening, wat met grote sociale en economische consequenties gepaard gaat. Afgaande op de demografische ontwikkelingen, zullen deze aantallen en de bijbehorende lasten in de komende decennia nog verder stijgen. Hoewel, steeds enkele honderden potentiële geneesmiddelen voor deze aandoeningen gelijktijdig in ontwikkeling zijn, ligt het aantal middelen dat daadwerkelijk toegelaten wordt al jaren rond de 10-15 per jaar (*Medicines in Development for Neurological Disorders 2013, 2018*). Veel kandidaatstoffen vallen pas tijdens de latere stadia van het ontwikkelingstraject af, vaak zelfs pas in de klinische fases, en veroorzaken zo grote vertragingen en hoge kosten voor de ontwikkeling van effectieve en veilige therapieën. Het is daarom van groot belang om zo vroeg mogelijk in het ontwikkelingstraject de farmacologische eigenschappen van kandidaatstoffen en daarmee hun inzetbaarheid als geneesmiddel in een betrouwbaar translationeel model te onderzoeken.

Achtergrond

Onze instelling verzorgt **5.1 lid2h** om farmaceutische bedrijven en academische instellingen inzicht te geven in de farmacologische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen deze ziekten. Met behulp van verschillende methodes kunnen wij werkingsmechanisme, effectiviteit en biodistributie van kandidaatstoffen testen. Een belangrijke pijler daarbij is de *in vivo* microdialysetechniek in ratten en muizen, eventueel in combinatie met monsterafname van bloed en CSF, gevolgd door farmacokinetische (PK) en farmacodynamische (PD) analyse van de genomen monsters, voornamelijk met high-performance liquid chromatography (HPLC) gevolgd door tandem-massaspectrometrie.

Context

Het hier aangevraagde project betreft het vervolg op een bestaand project binnen onze instelling. Onder projectvergunning AVD **5.1 lid2h** zijn voor onze klanten de afgelopen vijf jaar veel potentiële geneesmiddelen gericht tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel getest. In de eerste vier jaar van de vergunning (2016-2019) zijn per jaar tussen de 30 en 40 studies uitgevoerd. Onder andere naar aanleiding van deze studies worden momenteel minstens 10 (voor zover ons bekend) in klinische trials getest. Met behulp van onze microdialysetechniek zijn wij eerder al in staat geweest een bijdrage te leveren aan nieuwe geneesmiddelen die nu beschikbaar zijn voor patiënten. Enkele voorbeelden hiervan (voor zover we deze informatie mogen delen) zijn: Flibanserin (Addyi), Varenicline (Champix in de EU, Chantix in de VS) en Vortioxetine (Brintellix).

Het huidige project draagt bij aan de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel. Hoewel wij niet kunnen voorspellen met welke kandidaatstoffen onze (toekomstige) klanten ons de komende jaren zullen benaderen, hebben we de afgelopen jaren veelal potentiële geneesmiddelen tegen de ziekten van Alzheimer, Huntington en Parkinson, epilepsie, multiple sclerose, chronische pijn en zeldzame erfelijke ziekten voor onze klanten getest.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Doelstelling van het huidige project is het vergaren van translationele kennis over de biodistributie en farmacologie van potentiële nieuwe geneesmiddelen in verschillende hersengebieden, eventueel ten opzichte van de cerebrospinale vloeistof (CSF) en de algehele circulatie (bloed). Met behulp van de microdialysetechniek worden specifiek farmacokinetische (biologische beschikbaarheid) en farmacodynamische (effectiviteit) eigenschappen van de te ontwikkelen potentiële nieuwe geneesmiddelen bepaald. Deze informatie is essentieel om een goede translatie naar de kliniek mogelijk te maken. De gegenereerde informatie zal worden gebruikt voor de verdere ontwikkeling en mogelijke toekomstige registratie van het te testen potentiële geneesmiddel. Het preklinisch onderzoek dat wij uitvoeren (hoewel op zichzelf geen wettelijk vereist onderzoek) kan daarom onderdeel worden van een wettelijk verplicht pakket om deze kandidaatstoffen verder in de klinische fase te testen. De resultaten zullen dan door onze klant worden gebruikt voor het IND-rapport (IND= Investigational New Drug) om goedkeuring te krijgen voor first-in-human onderzoek.

Het directe doel is om met behulp van de microdialysetechniek zowel kwantitatief als kwalitatief de aanwezigheid, concentratie, en effecten/werkzaamheid van potentiële geneesmiddelen en hun metabolieten tijdsafhankelijk op lokaal niveau in specifieke hersengebieden van ratten en muizen te bepalen. De verzamelde data worden gebruikt door onze klanten om een besluit te nemen of een potentieel nieuw geneesmiddel in de kliniek getest gaat worden of niet.

Het uiteindelijke doel is om met de verkregen informatie de lokale biologische beschikbaarheid en effectiviteit van het potentiële geneesmiddel in de patiënt met grotere zekerheid te kunnen voorspellen. De fysiologische overeenkomsten tussen de hersenen van deze knaagdieren en die van de mens zijn groot, ook wat betreft de bloed-hersenbarrière, waarmee translatie naar de mens mogelijk is.

Daar de klanten in verschillende stadia van ontwikkeling van hun kandidaatstoffen onze diensten inroepen, verschillen de subdoelen en deelvraagstellingen per klant en per kandidaatstof. De klantvraag aan ons als **5.1 lid 2h** is onder andere afhankelijk van de al voorhanden kennis over de kandidaatstof, de expertise en assay-mogelijkheden die de klant zelf heeft, dan wel bij een andere partij wil afnemen. In overleg met de klant stellen wij enkele onderzoeksontwerpen voor die binnen onze instelling en de huidige aanvraag kunnen worden uitgevoerd om de vraag van de klant te beantwoorden. Voorbeelden van mogelijke deelvraagstellingen zijn:

- Komt de kandidaatstof over de bloed-hersenbarrière (in vergelijking met concentraties in het bloed en cerebrospinale vloeistof (CSF))? Wat is de verdeling van de kandidaatstof over de verschillende compartimenten? Komt de kandidaatstof in een voldoende hoge concentratie aan bij het target (doel-receptor)? Welke toedieningsroute geeft het beste profiel? (farmacokinetische parameters van de kandidaatstof)
- Wat is het effect van de kandidaatstof op endogene analyten zoals monoamines, aminozuren, eiwitten (biomarkers)? Wat is het effect van de kandidaatstof ten opzichte van een eventueel beschikbare referentiestof (bijv. agonist of antagonist)? (farmacodynamische parameters van de kandidaatstof)
- Zijn er indirecte effecten van de kandidaatstof op biomarkers (om vroegtijdig eventuele bijwerkingen te kunnen identificeren)?

Combinatie van al deze informatie vergroot de kennis van de werking en toepassing van potentiële nieuwe geneesmiddelen (en/of een deel van het ziekteproces), waarmee de verdere ontwikkeling van het geneesmiddel kan worden versterkt. De translationele waarde van de microdialysedata kan in sommige gevallen nog worden verhoogd door het ook afnemen van bloed en/of CSF, waarvan de kandidaatstof- en biomarkerconcentraties kunnen worden vergeleken met data uit klinische studies waar het wel mogelijk is om plasma- en eventueel CSF-data te verzamelen, maar niet om stofconcentraties in de hersenen te bepalen.

Haalbaarheid

Om het onderzoek te kunnen uitvoeren is het van belang dat de faciliteit niet alleen voldoet aan de wet op de dierproeven maar ook aan aanpalende wet- en regelgeving zoals het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013, de Opiumwet en Regulation (EC) 1069/2009 betreffende dierlijke bijproducten. Hiervoor zijn passende vergunningen of ontheffingen aanwezig.

De vergunninghouder is een Nederlandse dochteronderneming van de in de 5.1 lid2h . Als 5.1 lid2h heeft het bedrijf in Nederland een breed scala aan expertises van belang voor het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen. Klanten zijn wereldwijd farmaceutische bedrijven en academische instellingen. De faciliteiten zijn AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) geaccrediteerd.

Binnen onze instelling hebben we uitgebreide ervaring met microchirurgie en microdialyse in knaagdieren en bioanalyse van de afgenomen monsters. Deze ervaring is van belang om de vraagstelling, of de te onderzoeken potentiële geneesmiddelen voldoende in het doelhersengebied komen en daar de gewenste effecten hebben, te kunnen beantwoorden.

De onderzoekers hebben ruime ervaring in verschillende aspecten van geneesmiddelenontwikkeling en kunnen klanten daarom deskundig advies geven over de planning en het ontwerp van de uit te voeren onderzoeken, en de interpretatie van de resultaten. De biotechnici die de diergerelateerde handelingen uitvoeren zijn bevoegd en bekwaam om deze uit te voeren. De experimenten zijn van relatief korte duur en het is daarom haalbaar de aangevraagde meerdere studies uit te voeren binnen de maximale termijn van 5 jaar dat een aanvraag geldig is. De afgelopen jaren hebben we per jaar tussen de 30 en 40 CNS-microdialysestudies uitgevoerd.

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Bij het onderzoek binnen de huidige projectaanvraag zijn verschillende belanghebbenden.

De uit te voeren experimenten zijn bedoeld om voor onze **klanten** gegevens te genereren waarmee zij een selectie kunnen maken welke potentiële geneesmiddelen mogelijk tot verdere ontwikkeling in de klinische fase kunnen komen op basis van de farmacokinetische en farmacodynamische profielen.

De informatie die uit deze experimenten wordt afgeleid, wordt gebruikt om geschikte kandidaatstoffen voor te selecteren en hun toedieningsroute en dosis voor verder (pre)klinisch onderzoek te bepalen. Ongeschikte kandidaatstoffen worden uitgesloten van verdere ontwikkeling. Dit zal op zijn beurt het aantal **dieren** verminderen (wettelijke verplichting Wod) dat in toekomstige preklinische onderzoeken (wettelijk verplichte veiligheidsstudies voor markttoelating) zal moeten worden ingezet. Zoals boven genoemd, kan het preklinisch onderzoek dat wij uitvoeren door onze klanten gebruikt worden als onderdeel voor het IND-rapport voor het potentiële geneesmiddel.

In de klinische fase is er een ethische plicht om mensen die als **proefpersoon** meewerken aan klinisch onderzoek te beschermen tegen vermijdbare schade of lijden. Om die reden eisen medisch-ethische commissies solide data uit preklinisch onderzoek voordat ze een klinische proef met een experimenteel geneesmiddel toestaan. Dergelijke preklinische data kunnen in veel gevallen niet geproduceerd worden zonder gebruikmaking van dieren. Er zijn nog geen robuuste niet-dierlijke modellen die onverwachte neveneffecten van experimentele geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel kunnen voorspellen. De Europese richtlijnen verplichten daarom dat geneesmiddelen voor humaan gebruik worden getest in proefdieren.

Onze studies dragen bij aan het belang van de klant om hun kandidaatstof als geneesmiddel aan patiënten te kunnen verstrekken. Daarmee zijn de **patiënten** en hun familie en omgeving de uiteindelijke belanghebbenden.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Om onze klanten inzicht te geven in de mogelijkheden van potentiële nieuwe geneesmiddelen maken wij gebruik van herhaaldelijke monsterafname in hersengebieden met behulp van de microdialysetechniek. Elke studie binnen het project volgt in de basis de volgende opzet:

1. Gebruik van wildtype/gezonde dieren en/of ziektemodellen (ratten of muizen) in een of meerdere behandelingsgroepen ingedeeld
2. Implantatie van een of meerdere microdialyseprobes en eventueel een katheter en/of canule voor afname van bloed en/of CSF
3. Het toedienen van een of meerdere teststoffen (bijv. kandidaatstof en referentiestof) via een van verschillende mogelijke toedieningsroutes
4. Microdialyse met monsterafname uit een of meer hersengebieden gedurende minstens enkele uren, al dan niet gecombineerd met afname van CSF- en/of bloedmonsters
5. Terminatie van het dier, collectie van de hersenen en eventuele andere terminale monsters (bijv. CSF, bloed, ander weefsel)
6. *Ex vivo*: bepaling van de toegediende teststof(fen) en/of (ziekte-gerelateerde) relevante biomarkers in verzamelde vloeistof- en weefselmonsters

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Verschillende onderdelen van het project

De onderdelen van het project zijn de studies die we voor verschillende klanten uitvoeren. In elke studie wordt de farmacokinetiek (PK) en/of de farmacodynamiek (PD) van een of meerdere door de klant ontwikkelde kandidaatstoffen in een (gezond dan wel ziekte-) knaagdiermodel onderzocht. Soms vraagt de klant PK, soms PD, soms beide gecombineerd, soms na elkaar; soms vraagt de klant één studie aan, soms meerdere studies voor één kandidaatstof of groep kandidaatstoffen.

De opzet van ieder onderdeel van het project (studie) hangt dus af van de vraagstelling(en) van de klant. Per klant kunnen verschillende kandidaatstoffen (in dezelfde of verschillende studies) voorkomen. Voor elke studie wordt de exacte opzet door ons zorgvuldig bepaald aan de hand van keuzes over in ieder geval de volgende punten:

- modelsysteem (diersoort, -stam en eventueel ziektemodel (genetisch gemodificeerd of chemisch geïnduceerd), waarbij ziektemodellen pas ingezet worden als PK en PD in relevante wildtypedieren vastgesteld zijn, zij het niet noodzakelijk door onze instelling)
- te meten hersengebied(en)
- gewenste eigenschappen van de microdialyse-probe(s); lengte van de probe, type membraan, lengte van de membraan, implanteren van probe zelf of van "guide-canule" (een speciaal hiervoor ontworpen houder; in het geval van herhaalde, langdurige, of uitgestelde microdialyse)
- ook CSF en/of bloed? (m.b.v. geïmplanteerde canule/katheter of "met de hand", afhankelijk van hoe vaak bemonsterd dient te worden)
- te bepalen meetwaardes *ex vivo* (PK, PD, welke analyten; met bijv. massaspectrometrie, ELISA)
- te includeren groepen (bij PK is vaak geen controlegroep nodig, als naast de kandidaatstof ook een bekende receptor (ant)agonist toegediend wordt, kan hiermee ook informatie over het werkingsmechanisme van de kandidaatstof verkregen worden)
- groepsgrootte (wordt door de onderzoeker ingeschat op basis van kennis die binnen het bedrijf is opgebouwd over verschillende hersengebieden, biomarkers, etc., en op basis van de te verwachten variatie in reactie op de kandidaatstof {input klant} en in de meetwaardes {onderzoeker: bijv. minder variatie bij PK dan PD} en vervolgens getoetst aan de hand van een power-analyse)
- toedieningsroute van de teststof(fen), afhankelijk van o.a. eigenschappen kandidaatstof en/of

referentiestof, beoogde humane toedieningsroute en formulering

- concentratie en vehikel van de teststof(fen), afhankelijk van o.a. al bekende werkzame concentraties *in vitro*, oplosbaarheid, verdraagzaamheid voor het beoogde vehikel
- dosering en doseringsschema van de teststof(fen)
- tijdschema van monsterafname (gedurende uren – dagen {met uitgestelde of herhaalde microdialyse is zelfs monsterafname na weken mogelijk})
- te verzamelen organen en weefsels post mortem

Bij elk bovengenoemd punt wordt onze keuze bepaald door onder andere de exacte klantvraag (bijv. PK of PD), de eigenschappen van de kandidaatstof (bijv. oplosbaarheid, te verwachten tijdsspanne $\{T_{max}, T_{1/2}\}$), relevante biomarkers van de targetziekte (bijv. catecholamines, aminozuren of eiwitten meten), het targetmechanisme (bijv. bij een kandidaatstof tegen Alzheimer, amyloid of tau bepaalt welk beschikbaar ziektemodel relevant is). Allemaal samen bepalen deze punten hoe een onderdeel of studie door de onderzoeker optimaal opgezet kan worden, zie Tabel 1.

Tabel 1: Voorbeelden van 5 mogelijke onderzoeksopzetten. Studie A is een voorbeeld van de meest eenvoudige opzet met een enkele toediening en microdialyse op de dag na de implantatie. Bij kleine moleculen varieert de duur van bemonstering vaak tussen de 3 en 48 uur (waarin de verwachte T_{max} , $T_{1/2}$ en/of T_{∞} vallen. Bij grotere moleculen ligt dit tijdvenster eerder tussen de 3 en 28 dagen (maar dan niet met continue bemonstering).

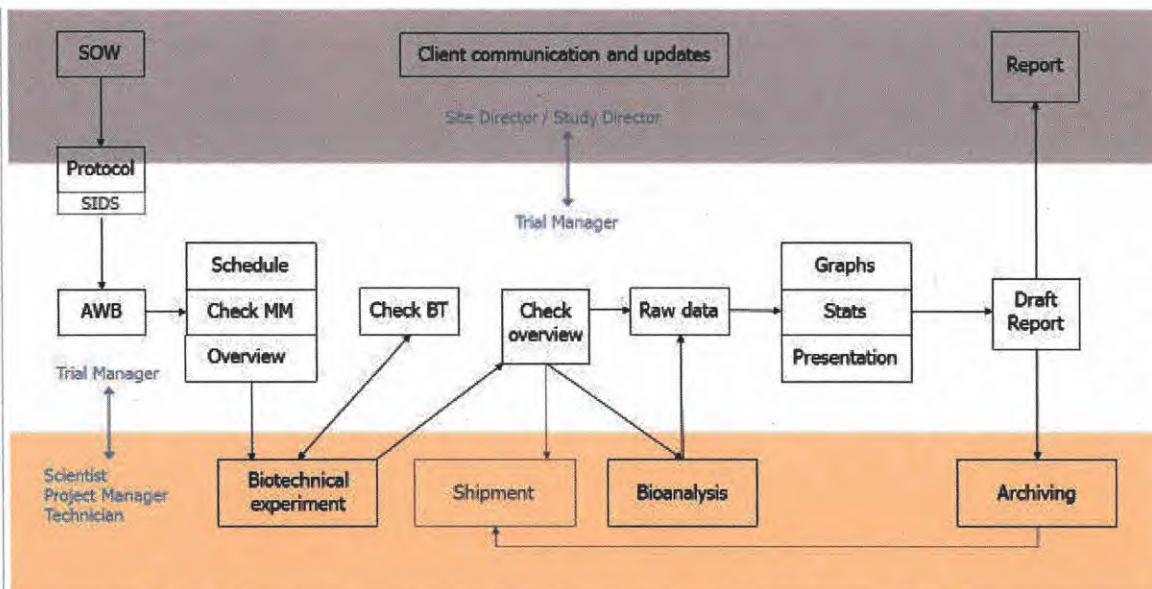
MD, microdialyse.

* Per targetgebied kan (bij gebruik van een guide-canule) maximaal 2 keer gedurende maximaal 24 uur continue bemonsterd worden. Bij bilateraal aangelegde targetgebieden kunnen beide geïmplantéerd worden en wordt het maximum 4 microdialyse-sessies.

studie	evt. toediening	operatiedag	toediening dag 1	microdialyse dag 1	evt. toediening	evt. microdialyse dag 2*
A		implantatie	- MD basale samples - toediening	- MD gedurende 3 uur - termineren		
B	subchronische toediening dagelijks, bijv. 3 dagen	implantatie	- MD basale samples - laatste toediening	- MD gedurende 12 uur - termineren		
C	chronische toediening dagelijks, bijv. 60 dagen	implantatie	- MD basale samples - laatste toediening	- MD gedurende 6 uur - termineren		
D		implantatie	- MD basale samples - eerste toediening	- MD gedurende 24 uur	subchronische toediening dagelijks, bijv. 3 dagen	- MD gedurende 3 uur op dag 3 - termineren
E		implantatie	- MD basale samples - eerste toediening	- MD gedurende 48 uur	chronische toediening dagelijks, bijv. 60 dagen	- MD gedurende 8 uur op dag 60 - termineren

De onderzoeker stemt deze informatie en vraagstellingen, aan de hand van een "study information data sheet" (SIDS), met de klant af en stelt een studie-opzet voor. Daarbij worden de al bekende eigenschappen van de kandidaatstof en beschikbare achtergrondinformatie in aanmerking genomen. Doses van de kandidaatstof worden gekozen op basis van de beoogde therapeutische dosis en eventueel al beschikbare farmacodynamische informatie om te voorkomen dat er bijwerkingen optreden. Als er in een eerder stadium door de klant al farmacokinetische studies zijn gedaan, worden deze gegevens ook meegenomen. De opzet van iedere studie wordt in samenspraak tussen onderzoeker en klant vastgesteld. De onderzoeker zal daarbij de klant informeren over de haalbaarheid van een studieontwerp. Als de klant akkoord is met het door de onderzoeker ontworpen studievoorstel dan zal het voorstel aan de IvD worden voorgelegd. Deze zal beoordelen of het voorstel past binnen de vergunning en zal het toetsen op basis van de wet op de dierproeven (art 10.1.3). Als de IvD van mening is dat het voorstel niet past binnen de toetsingskaders, dan zal de onderzoeker de vraag van de klant afwijzen of aangeven hoe een studie op basis van de vergunning wel kan worden uitgevoerd. Het advies van de IvD is doorslaggevend of een studie kan worden uitgevoerd of moet worden aangepast.

Schematisch ziet het proces van iedere studie er als volgt uit (Figuur 1).



Figuur 1: Flowchart van opzet, uitvoering, analyse en rapportage aan de klant van een studie.

AWB, animal welfare body (IvD); BT, bio-technisch team; MM, materialen en methoden; SIDS, study information data sheet; SOW, statement of work.

Nadat de onderzoeksopzet door de onderzoeker en klant is vastgesteld en door de IvD is getoetst zijn er binnen iedere studie nog go/no-go momenten gebaseerd op eventueel onverwacht ongerief bij de dieren.

- Als na toediening van de kandidaatstof(fen) een of meerdere dieren ernstige tekenen van ongerief vertonen die in onze SOP voor een HEP in aanmerking komen, wordt in overleg tussen de onderzoeker en de IvD verdere toediening gestaakt en de al ingezette dieren indien nodig (SOP) uit het experiment genomen.
- Bij studies met bijv. chronische toediening of langetermijneffecten zullen andere, studie-specifieke, go/no-go momenten van toepassing zijn die per studie met de IvD en animal welfare officer afgestemd zullen worden.
- Bij studies met ziektemodellen, waar sprake is van intrinsiek ongerief bij de dieren, worden modelspecifieke HEP-criteria afgestemd met de IvD en vastgelegd. Voor de meest gangbare modellen is door onderzoekers en IvD een matrix opgesteld met het te verwachten ongerief (zie in bijlage 1.3.2). Een voorbeeld van een vaker ingezet ziektemodel is de Huntington-muislijn Q175. De modelspecifieke SOP voor Q175 muizen is bij de aanvraag meegeleverd.

Het onderzoek binnen deze aanvraag is gericht op geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel. De eerste bepalingen van PK en PD dienen altijd in gezonde diermodellen plaats te vinden (dit kan echter ook bij de klant of elders gebeuren). Daarna kan het voor het beantwoorden van de klantvraag noodzakelijk zijn om gebruik te maken van transgene of chemisch geïnduceerde diermodellen voor deze ziekten. De bloed-hersenbarrière kan door deze ziekten worden aangetast, waardoor de PK van kandidaatstoffen kan veranderen. Als de PD-readout een verandering in een pathologische marker is (bijv. amyloid plaques of juist tau tangles) kan het noodzakelijk zijn de PD na initiële testen in gezonde dieren ook in een relevant ziektemodel te bepalen. Omdat het meest relevante ziektemodel per klant en (mechanisme van de) kandidaatstof kan verschillen, kunnen wij ons vooraf niet vastleggen op één ziektemodel per ziektebeeld (bijv. 5xFAD Tg {amyloid} of Tg(tauP301L)4510 {tau} muizen bij de ziekte van Alzheimer) of op een vooraf vastgelegd scala aan ziekten waarvoor we modellen in zullen moeten zetten. Wel zijn er ziektemodellen waar wij veel ervaring mee hebben, zowel genetisch gemodificeerde organismen (GGO) als chemisch geïnduceerde modellen. Deze worden beschreven in bijlage 1.3.2 en worden bij geschiktheid bij voorkeur ingezet bij klantvragen naar de bijbehorende aandoeningen. Wij staan echter ook open voor andere commercieel verkrijgbare ziektemodellen die voor de klant relevanter zijn, zij het vanwege een ander werkingsmechanisme waar de kandidaatstof (mogelijk) op aangrijpt, zij het vanwege de vergelijkbaarheid met al voorhanden studies of nog geplande studies buiten onze

instelling om.

Gebruikte typen dierproeven

Voor de verschillende mogelijke onderdelen/studies (PK, PD, werkingsmechanisme) blijft de basis-opzet van de dierproef steeds dezelfde:

- Implantatie van microdialyseprobes en/of katheter en/of canule
- Toediening van de teststof(fen)
- Microdialyse en evt. andere monsters verzamelen
- Termineren

Daarin onderscheiden we 2 typen dierproeven:

- 1) Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren, en
- 2) Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

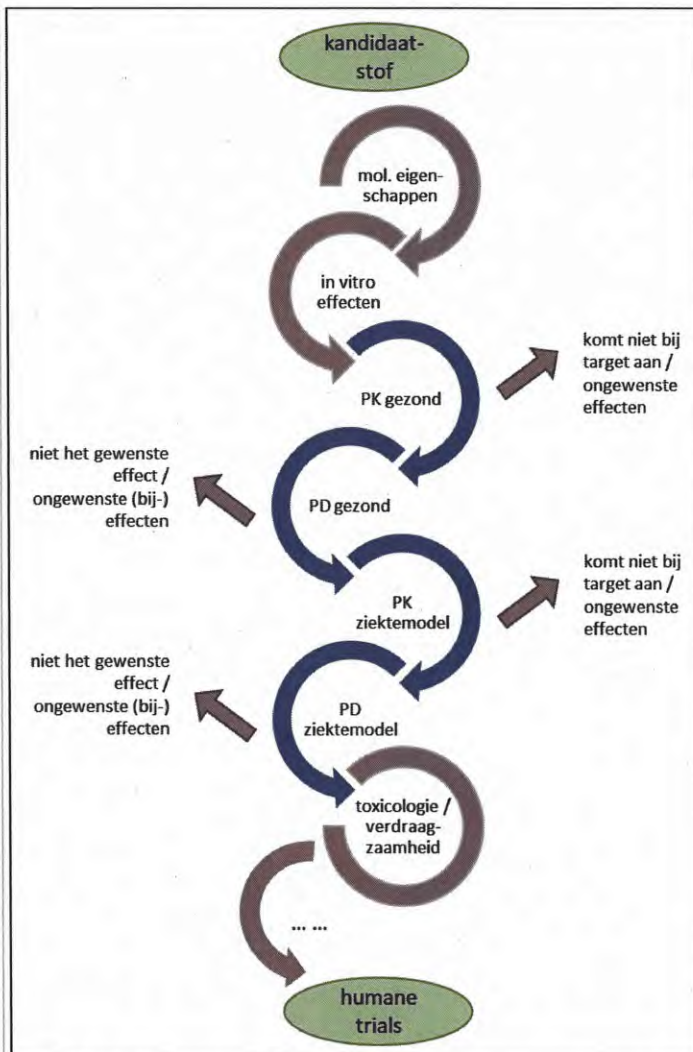
De samenhang tussen alle onderdelen van het huidige project bestaat uit het gebruik van de microdialysetechniek in de hersenen en uit de algemene opzet van de experimenten.

Daarbij kan het volgende onderscheid gemaakt worden:

- Tussen verschillende klanten hebben kandidaatstoffen en studies geen onderlinge relatie en zijn ook in de tijd onafhankelijk van elkaar. *(Met dien verstande dat als bij een bepaalde studie algemeen toepasbare verbeteringen (in bijv. operatietechnieken, toedieningsmethode, monsterafnamemethode) gevonden/ontwikkeld worden, die dan breder toegepast zullen worden.)*
- Per kandidaatstof (of groep kandidaatstoffen binnen één klant) bouwen de onderdelen of studies op elkaar voort en wordt bijv. de dosering of toedieningsroute in het volgende onderdeel aangepast aan de hand van resultaten uit eerdere onderdelen.

Aangezien niet alle onderdelen al benoemd kunnen worden *(zie 3.4.2: afhankelijk van welke klanten, welke kandidaatstoffen, welke kennis daarover al voorhanden is, welk ziekteproces het target is, welke hersengebieden daarbij betrokken zijn, welke ziektemodellen daarvoor beschikbaar zijn en eventueel door de klant in eerdere stadia al ingezet zijn, welke initiële klantvraag/-vragen, welke resultaten in eerste tests, welke vervolgvragen de klant daardoor eventueel heeft)*, kan de samenhang tussen alle toekomstige onderdelen ook niet vooraf definitief vastgelegd en beschreven worden.

Als verschillende onderdelen met elkaar samenhangen (zelfde kandidaatstof of groep kandidaatstoffen) variëren de onderdelen en hun onderlinge samenhang per klant. Soms wordt van tevoren met de klant al een bepaald traject (met verschillende deelstudies) vastgelegd en vervolgens op basis van verkregen resultaten in initiële tests eventueel aangepast. Soms komt de klant initieel met een vraag die in één experiment te beantwoorden is en volgen daaruit vervolgvragen en de opzet en IvD toetsing van vervolgexperimenten. Mogelijke onderdelen binnen het onderzoek naar een kandidaatstof zijn weergegeven in Figuur 2.



Figuur 2: Sterk vereenvoudigd overzicht van de verschillende stappen die een kandidaatstof kan doorlopen voordat deze in mensen getest kan worden, met een aantal beslismomenten. De exacte volgorde van de onderdelen ligt niet vast: de gekozen strategie kan per kandidaatstof of klant verschillen. In blauw de studies/onderdelen die de klant op basis van deze vergunning aan onze instelling uit kán besteden.

Voorbeelden van (het bepalen van) de verschillende onderdelen per klantvraag

- Studie F-I (PK en PD in meerdere studies)
 - Uitgangssituatie: nog geen PK in hersenen bekend.
 - Kandidaatstoffen: twee potentiële geneesmiddelen (kandidaatstof A en B) tegen amyloid plaques in ziekte van Alzheimer.
 - Klantvragen: PK en PD van beide kandidaatstoffen, in hippocampus, entorhinal cortex en plasma van 5xFAD muizen, om te bepalen welke doorontwikkeld kan worden.
 - Studie F: Implantatie van microdialyseprobe in hippocampus en katheter in vena jugularis van C57BL/6J muizen. Volgende dag microdialyse en bloedafname door katheter, 60-minuten monsters, één monster voor en 8 monsters na toediening van vehikel of een van twee kandidaatstoffen (A en B), 4 muizen per groep, termineren na laatste monster. Offline detectie van kandidaatstof in microdialysaat en plasma.
 - Studie G: Implantatie van microdialyseprobe in entorhinal cortex en katheter in vena jugularis van C57BL/6J muizen. Volgende dag microdialyse en bloedafname door katheter, 60-minuten monsters, één monster voor en 8 monsters na toediening van vehikel of een van

twee kandidaatstoffen (A en B), 4 muizen per groep, termineren na laatste monster. Offline detectie van kandidaatstof in microdialysaat en plasma.

- Studie H: Implantatie van microdialyseprobes in hippocampus en entorhinal cortex van C57BL/6J muizen. Volgende dag microdialyse, 30-minuten monsters, één monster voor en 15 monsters na toediening van vehikel of een van twee kandidaatstoffen (B in zelfde concentratie als bij studies H en I, A in zelfde en hogere concentratie, totaal 4 groepen), 6 muizen per groep, termineren na laatste monster. Offline detectie van kandidaatstof en concentratiebepaling van klassieke neurotransmitters in microdialysaten.
- Studie I: Implantatie van microdialyseprobe in entorhinal cortex van 5xFAD muizen. Volgende dag microdialyse, 30-minuten monsters, één monster voor en 8 monsters na toediening van vehikel of van kandidaatstof B, 6 muizen per groep, termineren na laatste monster, afname van terminaal bloed. Offline detectie van kandidaatstof en concentratiebepaling van klassieke neurotransmitters en amyloid in microdialysaat en plasma.
- Vervolg: klant test en ontwikkelt kandidaatstof B verder.

Waar er tussen de voorbeeldstudies F-I een duidelijke samenhang en fasering te herkennen is, is het ook mogelijk dat we alleen afzonderlijke onderdelen voor onze klant ontwerpen en uitvoeren. Daarom is het niet mogelijk om hier voor alle mogelijke toekomstige kandidaatstoffen en studies ongedifferentieerd samen te vatten hoe de fasering en go/no-go-momenten gekozen zullen worden.

Algemeen kan gezegd worden:

- Zoals in 3.4.2 genoemd, besluiten de onderzoeker en biotechnici (in samenspraak met de IvD en animal welfare officer) bij go/no-go-momenten binnen een studie wanneer onverwacht ongerief bij een of meerdere dieren optreedt.
- Tussen de onderdelen van een complexere studie wordt de vervolgstap bepaald aan de hand van a) de aanvaardbaarheid van eventueel geobserveerd ongerief bij de dieren in het afgeronde studieonderdeel en b) of de verwachte PK en/of PD waardes bereikt worden. Zo zal bij onverwachte resultaten een vervolgstap kunnen bestaan (bij afwezigheid van ongewenste effecten op de dieren) uit gebruik van een ander vehikel (indien mogelijk), hogere dosering, een andere toedieningsroute, bemonstering in een ander hersengebied of ander compartiment, langere monsterintervallen of juist een dichtere bemonstering zodat de optimale parameters bepaald zijn voordat overgegaan wordt naar een volgende geplande stap. Dit gebeurt altijd in samenspraak tussen de onderzoeker, de klant, de IvD en de animal welfare officer. Wordt er geen acceptabele combinatie tussen a) en b) gevonden, dan wordt met de klant overlegd het onderzoek naar deze kandidaatstof niet verder te vervolgen.
- Pas als in gezonde dieren met maximaal matig ongerief (onderzoeker en biotechnici) en de verwachte distributie en werkzaamheid (advies onderzoeker aan klant) bereikt zijn (zij het in onze instelling, zij het bij de klant of elders) kan een kandidaatstof via dezelfde route en met vergelijkbare dosering aan ziektemodellen toegediend worden (zie 3.4.2).
- De onderzoeker zal op basis van de uitkomsten van de studie en de vraagstelling van de klant beslissen of de studie voortgezet kan worden.

Dierenwelzijngerelateerde beëindigingscriteria voor individuele dieren, dierproeven en voor een kandidaatstof liggen bij de onderzoeker (met de IvD).

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren
2	Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen
3	
4	

5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
4. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.

Volgnummer	Type dierproef
------------	----------------

1	Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren
---	--

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Experimentele aanpak

De hier aangevraagde experimenten zijn erop gericht om *in vivo* informatie over de biologische distributie/kinetiek en de farmacodynamiek van potentiële geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel te verkrijgen. Deze informatie wordt gebruikt om de selectie van kandidaten te ondersteunen voor verdere ontwikkeling tot een geneesmiddel voor humaan gebruik.

Om later herhaald monsters te kunnen nemen uit een of meerdere hersengebieden, cerebrospinale vloeistof (CSF) en/of bloed worden dieren tijdens een operatie voorzien van (een) microdialyseprobe(s), dan wel guide-canule(s), met eventueel een canule in de cisterna magna en/of katheter in de vena jugularis/femoralis.

Daarnaast worden kandidaatstoffen toegediend om hun farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen te kunnen bepalen. Toediening geschiedt afhankelijk van de eigenschappen van de kandidaatstof en de vraagstelling van de klant bijvoorbeeld *per os*, intraveneus, intraperitoneaal of intracisterna-magna en, ook weer afhankelijk van de eigenschappen van de kandidaatstof en de vraagstelling, eenmalig of (sub-)chronisch.

Na de implantatie kunnen vanaf de volgende dag gedurende meerdere uren (tot dagen) monsters verzameld worden zonder dat de dieren veel gestoord worden. Daarna worden primaire uitkomstparameters *ex vivo* veelal met behulp van massaspectrometrie of ELISA bepaald.

Primaire uitkomstparameters

- Farmacokinetiek van de kandidaatstof: aanwezigheid (kwalitatief) en concentratie (kwantitatief) in vloeistofmonsters uit (verschillende) targethersengebied(en), CSF, en/of bloed over de tijd na toediening van de kandidaatstof.
- Farmacodynamiek van de kandidaatstof: concentratie van biomarkers in (verschillende) targethersengebied(en) over de tijd, in reactie op de toediening van kandidaatstof(fen).

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Tijdens het onderzoek kunnen de volgende handelingen worden uitgevoerd (* voor optionele handelingen):

- **Acclimatisatiefase:**

Na aankomst in het vivarium krijgen de dieren de tijd om gewend te raken aan hun nieuwe kooi, voeding en andere omgevingsfactoren. Dit bevordert zowel het dierenwelzijn als de reproduceerbaarheid van experimentele resultaten. De acclimatisatiefase duurt minimaal 7 dagen.

- **Voedselrestrictie *:**

Het kan in een enkel geval voorkomen dat de dieren bij orale toediening van de kandidaatstof "nuchter" moeten zijn. In deze gevallen zullen de dieren gedurende maximaal 8 uur voor toediening gevast worden. Aangezien de meeste toedieningen in de ochtend plaatsvinden, en de microdialyse daaropvolgend gedurende de dag, zal deze voedselrestrictie in de actieve periode van de dieren plaatsvinden. Er is gekozen voor een maximum van 8 uur omdat een vastenperiode van 6 tot 7 uur bij ratten en muizen vaak resulteert in een vergelijkbare maaglediging als bij langere vastenperiodes (bv. Prior et al., 2012; Hauff & Nebendahl, 2017). Hierbij wordt alleen het voer weggenomen, de dieren hebben *ad libitum* toegang tot drinkwater. Dit is, net als bij al toegelaten geneesmiddelen, afhankelijk van stofspecifieke eigenschappen en gebeurt alleen als er al gegevens over de kandidaatstof bekend zijn dat dit voor opname van de stof noodzakelijk is. Ter indicatie, in het verleden betrof dit hooguit 1 of 2 studies per periode van 5 jaar. De verwachting is dus, dat voedselrestrictie hoogstens maar bij enkele studies nodig zal zijn.

- **Implantatie van microdialyseprobe(s) met of zonder cisterna magna canule en/of vena jugularis/femoralis katheter**

Voor het uitvoeren van een microdialyse-experiment worden één of meerdere probes chirurgisch in de hersenen aangebracht. Het plaatsen van de probes vindt altijd onder diepe (inhalatie) anesthesie plaats, in combinatie met een systemisch analgeticum en topicale anesthesie, op een verwarmde ondergrond en met individuele temperatuurcontrole indien de te verwachten operatieduur meer dan 30 minuten is.

Afhankelijk van de vraagstelling wordt de meest geschikte probe gekozen:

- de conventionele probe, geschikt voor collectie van neurotransmitters en "small molecules",
- de metaquant probe, waarmee absolute concentraties van stoffen kunnen worden bepaald (veel gebruikt voor de PK van kandidaatstoffen),
- de push-pull probe, deze is door zijn poriegrootte zeer geschikt voor het bemonsteren van grotere (eiwit) biomarkers en "large molecules"

De coördinaten voor de plaatsing van de probe(s) worden vooraf bepaald op basis van het te bemonsteren hersengebied met behulp van een relevante stereotactische hersen-atlas:

- Paxinos G. and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, compact 6th edition, 2009
- Franklin K.B.J. and Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, compact 3rd edition, 2008

- a) Boven het doelgebied in de hersenen wordt een zo klein mogelijk incisie gemaakt in de hoofdhuid.
- b) Topicaal anestheticum wordt aangebracht, inwerktijd ca. 5 minuten.
- c) Periost wordt verwijderd.
- d) Met een trepaanboor worden verdiepingen in de schedel geboord waar schroefjes in gezet kunnen worden waaraan (zie h) de probe kan worden vastgezet.
- e) Met een trepaanboor wordt een gaatje door de dorsale zijde van de schedel geboord, boven het hersengebied.
- f) De meninges worden voorzichtig met de tip van een naald geopend.

- g) Met behulp van een stereotactisch frame wordt een microdialyseprobe (of een "guide-canule", een speciaal hiervoor ontworpen houder, met daarin een probe of een stilet; in het geval van herhaalde, langdurige, of uitgestelde microdialyse) exact boven het hersengebied gepositioneerd en langzaam in de hersenen naar binnen gebracht met een vloeiende draaibeweging van de micromanipulator op de stereotact.
- h) De probe of guide-canule wordt met schroefjes en een speciaal biocompatibel polymeer vastgezet op de schedel.

Wanneer het nodig is om stofconcentraties in de verschillende compartimenten (bloed, hersenen, CSF) te bepalen wordt tijdens dezelfde operatie een katheter of canule aangelegd in de bloedbaan of de cisterna magna.

- Voor het nemen van bloedmonsters (of bloeddialysaatmonsters) wordt de katheter geplaatst in de vena jugularis of de vena femoralis. Het uiteinde van de katheter wordt op de schedel bevestigd op vergelijkbare wijze als bij de microdialyseprobes.
- Voor het nemen van CSF-monsters wordt een canule geplaatst in de cisterna magna, op dezelfde wijze als de plaatsing van microdialyseprobes.

Na plaatsing van de probe(s) en eventueel katheter en/of canule (implantaten) wordt de incisie gesloten, waarna de dieren rustig kunnen bijkomen van de anesthesie. Afhankelijk van het aantal te plaatsen implantaten duurt de operatie per dier tussen 20 en 90 minuten. Tijdens de recovery worden de dieren warm gehouden door middel van een warmtematje en gemonitord. Wanneer de dieren volledig wakker zijn, worden ze individueel in experimentele kooien gehuisvest om beschadiging van elkaars operatiewond of implantaten te voorkomen. Waar mogelijk worden de dieren zodanig gehuisvest dat ze elkaar kunnen horen, zien, en ruiken; bij langer durende individuele huisvesting is dat tot de overbrenging in experimentele kooien zoveel mogelijk per paar in een kooi met een geperforeerde perspex scheidingswand voor beperkt contact zonder dat de implantaten kunnen worden beschadigd en daardoor het experiment gevaar kan lopen.

• **Toediening van kandidaatstof, vehikel, en/of referentiestof:**

Het individuele dier wordt één of meerdere keren (maximaal 60 keer in totaal, bijv. 2 maanden dagelijks, of 1 maand tweemaal daags) een dosering van de teststof(fen) (kandidaatstof of vehikel, en/of referentiestof) toegediend. Als naast de kandidaatstof ook een bekende receptor (ant)agonist als referentiestof toegediend wordt, kan hiermee ook informatie over het werkingsmechanisme van de kandidaatstof verkregen worden. De volgende toedieningsroutes worden (in overleg met de klant over de geschiktheid/toepasbaarheid voor de specifieke vraagstelling en eigenschappen van de kandidaatstof) **bij voorkeur** gebruikt:

- Onverdoofd: intraperitoneaal, subcutaan, oraal (per gavage of in het dieet), intraveneus (eventueel via geplaatste katheter), lokaal door de microdialyseprobe (alleen van toepassing bij PD). Daarnaast kan, indien de al bekende eigenschappen van de kandidaatstof hiertoe aanleiding geven, gebruik worden gemaakt van:
 - Onverdoofd: intramusculair, rectaal, intranasaal.
 - Onder anesthesie (bij voorkeur worden deze administraties gedaan tijdens de bovenbeschreven operatie, en zullen vooral relevant zijn voor biological kandidaatstoffen zoals AAV-virussen en antisense oligonucleotiden): intracerebroventriculair, intracerebraal, intrathecaal, toedieningen in specifieke organen (zoals bijvoorbeeld intracardiaal).

De keuze voor de toedieningsroute vindt voor iedere studie in de planningsfase plaats, waarna de onderzoeksoepzet aan de IvD wordt voorgelegd. Mocht in een studie een gekozen toedieningsroute ontoereikend of ongeschikt blijken (bv. onvoldoende recovery van de kandidaatstof in de offline analyse van de microdialysemonsters na een PK-studie), dan kan in overleg met de klant besloten worden dat de onderzoeker een vervolgstudie ontwerpt met een andere toedieningsroute, die vanzelfsprekend ook weer aan de IvD wordt voorgelegd.

Waar van toepassing worden richtlijnen voor administratie uit de literatuur gebruikt, bijvoorbeeld "Handboek proefdierkunde" door L.F.M. van Zutphen (2009), Diehl et al (Journal of Applied Toxicology (2001) 21:15-23). Toedieningstechnieken worden uitgevoerd volgens gestandaardiseerde en getrainde werkinstructies.

Veelal zal de toediening van de kandidaatstof(fen), referentiestof(fen) of vehikel na een aantal basale monsters tijdens de microdialyse plaatsvinden om pre- met postdoseringsmonsters te kunnen vergelijken.

Bij (sub)chronische toediening of als sprake is van langetermijneffecten kan toediening ook al voor de implantatie van de microdialyseprobe(s) aanvangen.

De toediening zal in de meeste gevallen in de eerste uren van de lichtfase plaatsvinden. Indien de activiteit van het dier bepalend is voor de neurofysiologie van het mechanisme waar de kandidaatstof op aangrijpt en dus de transleerbaarheid naar de mens volgens ons in het gedrang komt, hebben we de mogelijkheid het dag-nacht-ritme van de dieren om te keren. In overleg met de klant beslist de onderzoeker over de noodzakelijkheid hiervan.

- **Klinische observaties**

Na de operatie en na toediening van stoffen worden de dieren geobserveerd. Hierbij wordt gekeken naar algemene klinische verschijnselen die op effecten van de toediening van de stof en/of verminderd welzijn kunnen duiden. De dieren worden beoordeeld aan de hand van de door de IvD opgestelde beslisboom in de interne SOP Animal discomfort and humane endpoints. Bevindingen worden vastgelegd in het welzijnsdagboek van ieder individueel dier en de studie-overview.

- **Microdialyse**

16 tot 18 uur na afloop van de operatie is de bloed-hersenbarrière gesloten, wordt geen interferentie meer verwacht en kan de microdialyse gestart worden. Bij de dieren in de experimentele kooien worden de geïmplanteerde microdialyseprobes via slangetjes met een microperfusiepompe buiten de kooi verbonden. Tijdens het bemonsteren stroomt een iso-osmotische vloeistof door de probe, met een snelheid van 0,1 tot enkele microliters per minuut. De uitstromende vloeistof uit de outletslangetjes wordt per dier en per hersengebied opgevangen om tot bijv. 10-, 15-, 30-, 60-, of 240-minutenmonsters te komen. De bemonsteringssnelheid is afhankelijk van de vraagstelling van de klant en van de al bekende eigenschappen van de kandidaatstoffen. Voordat de experimentele monsters verzameld worden, is er een stabilisatiefase van 1,5 tot 2 uur, waarin de dieren wennen aan de slangetjes en de niveaus van biomarkers in de opgevangen monsters stabiliseren. Over het algemeen worden eerst alle monsters verzameld en opgeslagen en vervolgens met behulp van bijvoorbeeld high-performance liquid chromatography (HPLC) gevolgd door tandem-massaspectrometrie geanalyseerd. Zodra de probe op de microperfusiepompe is aangesloten, moet continu worden geperfuseerd met de iso-osmotische vloeistof om dezelfde probe te kunnen blijven gebruiken. Daarom wordt in sommige gevallen in plaats van de probe zelf een zogenaamde guide-canule geïmplanteerd. Door een guide-canule kan (door weefselschade en activatie van microglia) maximaal tweemaal hetzelfde hersengebied met een nieuwe probe gedurende 24 uur worden bemonsterd. Kort voor de eigenlijke microdialyse (meestal 1 dag ervoor) wordt bij het wakker dier een precies passende microdialyseprobe in de guide-canule geplaatst. (1) Als herhaald bemonsterd moet worden, bijvoorbeeld aan het begin en einde van een (sub)chronische toediening van kandidaatstof, kan de probe na de eerste microdialyse-sessie vervangen worden door een stilet, die weer vlak voor de tweede microdialyse-sessie door een nieuwe microdialyseprobe vervangen wordt. (2) Ook als de microdialyse pas verschillende dagen tot weken na de implantatie plaatsvindt, is de implantatie van een guide-canule (met stilet die kort van tevoren vervangen wordt door de eigenlijke probe) de aangewezen manier om tot betrouwbare bemonstering te komen. (3) Als gedurende meer dan 30 uur onafgebroken moet worden bemonsterd, is het ook zekerder om een guide-canule te implanteren, zodat als een probe na zo lange tijd eventueel verstopt raakt, deze vervangen kan worden en daarmee het betrokken dier niet voortijdig geterminerd zou moeten worden.

Bij sommige studies wordt tijdens de microdialyse ook bloed en/of CSF verzameld (zie navolgende punten).

- **Verzameling bloedmonsters ***

Bloedafname voor en/of na toediening van de kandidaatstof gebeurt via de staartvene (voorkeur bij rat), aangezichtsvene (voorkeur bij muis), en bij herhaaldelijke monsterafname door de geplaatste katheter in de vena jugularis/femoralis. De afname van bloedmonsters is bij voorkeur beperkt tot maximaal 8 monsters van in totaal 10% van het totaal bloedvolume per 24 uur en tot een absoluut maximum van 15% van het totaal bloedvolume in 24 uur, waarbij boven de 10% vervangende vloeistof (fysiologische zoutoplossing) wordt gegeven volgens een interne SOP en met de klant wordt gesproken over de noodzaak van de overschrijding van 10% van het bloedvolume. Een absoluut maximum van 20%, met vervangende vloeistof, kan alleen verdeeld over verschillende dagen afgenomen worden. Eventuele herstelperiodes zijn 7 dagen voor 7,5 tot 10%, 14 dagen voor 10 tot 15% en 21 dagen voor 15 tot 20%. Vanwege de veelal korte

experimenten zal er na het afnemen van deze volumina vaker sprake zijn van termineren dan van herstel. Als leidraad voor de interne SOP is gekeken naar Diehl (2001), deze geeft in tabel 4 aan dat bij meerdere monsternames tot 20% kan worden afgenomen in 24h met 3 weken herstel. Samengevat richten wij ons dus op een maximum van 10% van het totaal bloedvolume, wanneer dit wordt overschreden wordt met de klant gesproken over de noodzaak van grotere volumina. Wanneer deze noodzaak aantoonbaar is, is 20% de uiterlijke bovengrens. Bij een afname van boven de 10% wordt vervangende vloeistof (fysiologische zoutoplossing) gegeven.

- **Verzameling cerebrospinale vloeistof ***

Indien nodig kunnen in de periode na toediening ook CSF-monsters worden verzameld om farmacokinetische en farmacodynamische parameters te bestuderen. Deze monsters worden genomen door de geplaatste canule in de cisterna magna. De afname van CSF-monsters is beperkt tot 4 monsters van 7-10 µl van een muis en 8 monsters van 10-20 µl van een rat per 24 uur. Door de CSF-productie van 0.3 µL per minuut in de muis en meer bij grotere diersoorten wordt de afgenomen vloeistof ruimschoots weer aangevuld (Pardridge, Expert Opin Drug Deliv 2016: 13, 963-975).

Terminatie

Aan het eind van het experiment zullen de dieren onder inhalatie-anesthesie worden getermineerd met een barbituraat, zodat de hersenen kunnen worden verwijderd om de plaatsing van de probe(s) te verifiëren. Dit gebeurt op een wijze in overeenstemming met bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Tevens kan er weefsel, terminaal bloed, en/of terminaal CSF worden uitgenomen voor verdere *ex vivo* bepalingen. In enkele gevallen, wanneer post-mortem weefsel zonder bloed moet worden uitgenomen, kan transcaderiale perfusie onder inhalatie-anesthesie onderdeel uitmaken van het terminatieprotocol.

De gebruikte methoden voor implantatie, toediening, monsterafname, anesthesie, euthanasie, bloed-CSF, uitname van hersen- en ander weefsel zijn gedocumenteerd in standaardprocedures.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Het aantal dieren dat nodig is voor een experiment is afhankelijk van de vraagstelling en de uiteindelijk te bepalen uitkomstparameter(s). Op basis van een statistische poweranalyse is in het verleden de benodigde groepsgrootte voor de verschillende typen experimenten berekend. Dit loopt uiteen van 4 tot 16 dieren per dosering (afhankelijk van de variatie in de concentratie van de te bepalen biomarker of kandidaatstof, hierbij is ook het te bemonsteren hersengebied van belang, en wordt getoetst met een poweranalyse).

- Voor farmacokinetische studies met behulp van een **5.1 lid2h** zijn minimaal data van 4 dieren nodig, in combinatie met bloed- en CSF-afname adviseren wij de klant een aantal van 5 dieren.
- Voor de klassieke neurotransmitters (monoamines en aminozuren) zijn 5 tot 6 dieren per dosering voldoende.
- Voor neurotransmitters waarvan bekend is dat basale concentraties sterk variëren, zoals histamine en acetylcholine, zijn 7 tot 8 dieren nodig.
- Voor studies aan metaboliëten van de kynurenine-pathway zijn 7 tot 8 dieren nodig.
- Voor studies aan eiwitten zijn 8 tot 12 dieren nodig.
- Wanneer voor de navolgende analyse(s) veel plasma of CSF moet worden verzameld, kan bij muizen de groepsgrootte oplopen tot 16 dieren.
- Voor niet eerder geteste biomarkers zal eerst op basis van een pilotstudie de bioanalytische variatie moeten worden bepaald om de groepsgrootte voor een volledige studie te kunnen bepalen. Hierbij wordt voor t-tests, bijvoorbeeld bij het vergelijken van area-under-the-curve (AUC), een poweranalyse volgens <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html> gebruikt met een alfa van 0,05 en een power (1-beta) van 0,8. Voor gecompliceerdere experimenten, zoals repeated measures ANOVA, gebruiken we ook de online beschikbare software G*Power (<https://www.psychologie.hhu.de/arbeitsgruppen/allgemeine-psychologie-und-arbeitspsychologie/gpower.html>).

Het aantal groepen in een experiment wordt geminimaliseerd door het studie-ontwerp goed op te zetten:

- Doseringen worden gekozen op basis van de voorhanden zijnde informatie over de kandidaatstof. Voor de bepaling van farmacokinetiek is niet altijd een controlegroep (vehikel) nodig.

- Tijds punten goed kiezen, zodat er zo min mogelijk monsters hoeven worden verzameld, maar wel alle relevante tijds punten meegenomen worden op basis van kennis over de werking van de kandidaatstof en het moleculaire target.
- Goede randomisatie, waar mogelijk blinderen van de experimentator, gebruik van pilotgroepen en toedieningen bij verschillende dieren verspreid over de dag, waardoor bij eventuele negatieve gevolgen voor het dierwelzijn tijdig ingegrepen kan worden en eventueel de experimentele opzet herzien.

Ons streven is altijd om betrouwbare resultaten te vinden met gebruik van zo min mogelijk dieren.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoorten

Onze instelling heeft expertise in het toepassen van de microdialysetechniek in muizen en ratten. De experimenten in deze bijlage worden uitsluitend met gezonde wildtype dieren uitgevoerd. Voor de verschillende onderzoeken wordt per klant en per studie bepaald welke diersoort het meest geschikt is voor het beantwoorden van de specifieke vraag, gecombineerd met het minste te verwachten lijden (in aantal en individueel ongerief). Daarbij valt vaak de keuze op ratten als microdialysaat uit meerdere hersengebieden nodig is: bij muizen kunnen maximaal twee implantaten per dier geplaatst worden (1 MD-probe met JV-katheter óf CM-canule, of 2 MD-probes, of JV-katheter en CM-canule) bij ratten zijn dat er maximaal vier. Als er meer verschillende monsters nodig zijn, moet dat in verschillende dieren gebeuren. Als vervolgstudies (binnen deze aanvraag of elders door de klant) in een bepaald ziektemodel gepland zijn, worden de initiële studies zoveel mogelijk in dezelfde soort gedaan (bijv. rat voor vervollexperimenten met Parkin KO rat voor een potentieel geneesmiddel tegen de ziekte van Parkinson, muis voor vervollexperimenten met Tg(tauP301L)4510 muizen voor een potentieel geneesmiddel tegen de ziekte van Alzheimer).

Herkomst

Alle dieren zullen worden verkregen van erkende instellingen voor het fokken van proefdieren.

Geslacht en levensstadium

Deze experimenten kunnen zowel in mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd worden. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de klant het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide geslachten benadrukt. Desondanks zien we dat het merendeel van de gebruikte dieren nog steeds mannelijk zijn. Voor de klant is het vaak belangrijk om de vergelijkbaarheid met eventueel voorafgaand uitgevoerde *in vivo* studies of opvolgende *in vivo* studies veilig te stellen. De klant zal in dat geval moeten aangeven dat een specifiek geslacht passender is in het totale ontwikkelingstraject.

In de meeste studies worden (jong)volwassen dieren ingezet. Vaak is dat voor de klant een relevante leeftijd. Verder zijn de stereotactische operaties die wij uitvoeren bijv. qua coördinaten voor volwassen dieren geoptimaliseerd. Ook is er bij volwassen dieren meer ruimte op de schedel om de verschillende probes vast te zetten, waardoor bij meerdere meetgebieden het aantal dieren zo laag mogelijk gehouden kan worden. Daarom vinden de implantaties bij voorkeur bij (jong)volwassen dieren plaats, vanaf een leeftijd van 8 weken, bij een gewicht van 250-350 gram voor ratten en 20-25 gram voor muizen. Wanneer dat voor de studie-opzet noodzakelijk is, kunnen dieren tot maximaal 18 maanden geopereerd worden, met bij ratten aangepaste coördinaten volgens Tabel 1 in de bovengenoemde hersenatlas.

Om aan veroudering gerelateerde ziektes te bestuderen worden soms ook oudere dieren ingezet, of juist pasgeboren dieren wanneer het gaat om een genetische afwijking die vanaf de eerste levensdagen moet worden bestreden met een passende therapie. In dat laatste geval zal het dan gaan om toediening op of vanaf de vroeg postnatale leeftijd, terwijl de probe-implantatie en de daaropvolgende microdialyse in het (jong)volwassen dier zullen plaatsvinden. In het intakeformulier voor een studie (study information data sheet, SIDS) wordt de klant specifiek gevraagd de keuze voor het diermodel, leeftijd en geslacht te motiveren. Waar nodig wordt de klant naar de motivatie voor zijn keuze gevraagd en bij zijn keuze geadviseerd.

Geschatte aantallen

In de laatste ~40 studies, uitgevoerd onder projectvergunning AVD5.1 lid2h is gewerkt met een

groepsgrootte van 4-20 (gemiddeld 6), aantal groepen 1-8 (gemiddeld 3), en tussen 3 en 100 (gemiddeld 18-20) dieren per studie, waarvan 40% muizen en 60% ratten. Op basis daarvan is de volgende schatting gemaakt; bij 40 studies per jaar zijn dat maximaal 750 dieren per jaar, dus 3750 over een periode van 5 jaar voor de gehele projectaanvraag.

Daarvan zullen een aantal experimenten in ziektemodellen gedaan worden (beschreven in bijlage 1.3.2)
Geschatte aantallen voor deze bijlage: 1200 muizen en 1800 ratten (40% en 60% van totaal 3000 dieren).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

De vergunninghoudende instelling is actief betrokken bij het Nederlandse 3R-research centrum en heeft regelmatig contact met wereldwijde regelgevende instanties en het FELASA netwerk (Federation of European Lab Animal Science).

In het licht van de NCad-richtlijn 'Transitie naar proefdier-vrij onderzoek' worden studieontwerpen regelmatig herzien (in combinatie met veranderende richtlijnen of aanbevelingen) en op ad-hoc basis (in samenwerking met de klant) om beschikbare verfijningen op te nemen, om het aantal dieren te minimaliseren of de ernst van het ongemak te verminderen. Het bedrijf is actief betrokken bij sector-overschrijdende initiatieven, gericht op het toepassen van de 3V's.

Vervanging

Op dit moment bestaat er geen goed geïsoleerd systeem waarmee de hersenen in al hun complexiteit en samenspel met andere organen kunnen worden bestudeerd. Vervanging van deze experimenten is daardoor slechts ten dele mogelijk. Het testen van een potentieel geneesmiddel moet uiteindelijk altijd gebeuren in een intact organisme, zodat de volledige fysiologie en ook potentiële bijwerkingen kunnen worden vastgesteld. De kinetiek van farmaca wordt in grote mate bepaald door de doorbloeding van de organen, bovendien kan het zijn dat de kandidaatstof in het lichaam een secundair (off-target) effect heeft, waardoor de *in vitro* gemeten reactie *in vivo* niet plaatsvindt of wordt geremd of juist versterkt. Alleen kandidaatstoffen die in *in vitro* testen veelbelovend zijn, worden ingezet in dierproeven. Wel bestaan er plannen om in de nabije toekomst hersen-organoïden te gaan kweken en te testen of deze bij onze studies gebruikt kunnen worden. Dit is een interessante ontwikkeling maar nog in een vroeg stadium. Uiteindelijk hopen we hiermee een deel van de dierexperimenten te kunnen vervangen. Immers, de organoïden kunnen een goed model zijn voor de hersenen, maar (nog) niet voor het geheel van lichaam en hersenen en de bloed-hersenbarrière.

Vermindering

Allereerst wordt het aantal te gebruiken dieren verminderd doordat kandidaatstoffen voordat ze in dieren getest worden, eerst *in vitro* gekarakteriseerd, veelal bij de klant of bij andere [5.1 lid 2n](#). Zonder deze gegevens wordt een stof niet aan een dier toegediend. Om het gedrag van de te testen kandidaatstof (potentiële geneesmiddel) in het gekozen bemonsteringssysteem (microdialyseprobes) en de meetbaarheid met de *ex vivo* meetmethodes (veelal massaspectrometrie) te bepalen, wordt bij microdialyse ten behoeve van PK eerst een *in vitro* microdialyse doorgevoerd alvorens de kandidaatstof in dieren te testen.

In vergelijking tot methoden waarbij op elk tijdstip dieren moeten worden getermineerd om hersenextracten te prepareren zijn er bij de microdialysetechniek veel minder dieren nodig om op verschillende tijdstippen gegevens te verzamelen over de biodistributie (PK) en/of effecten (PD) van een kandidaatstof. Als PK en PD binnen één studie gecombineerd gemeten kunnen worden (niet altijd mogelijk vanwege bijv. verschillende probe-eigenschappen, of niet wenselijk vanwege bijv. eerst dosisbepaling), vermindert het aantal proefdieren dat nodig is in de preklinische fase nog sterker. Deze strategie biedt tevens het voordeel dat de aan elkaar verbonden data (uit hetzelfde dier) betere informatie leveren dan wanneer de data uit verschillende dieren zouden worden verzameld. Door verder ontwikkeling van de post mortem offline analysemethodes kunnen steeds meer analyten per monster gemeten worden, waardoor het aantal benodigde dieren verder vermindert. Ook zijn de operatietechnieken verder ontwikkeld waardoor meer probes per dier geïmplanteerd kunnen worden.

Bij de opzet van elke studie worden de groepen en groepsgroottes, te bemonsteren hersengebieden en eventuele andere monsters, kandidaatstofconcentraties en doseringsschema's zorgvuldig gekozen om uit zo min mogelijk dieren alle benodigde informatie te verkrijgen. Door in het experimenteel ontwerp randomisatie, pilotgroepen en verspringende administraties toe te passen, is het vaak mogelijk om eventuele uitval op te vangen zonder dat we monsters missen voor bepaalde tijdstippen. Waar mogelijk wordt bij studies met meerdere kandidaatstoffen hetzelfde vehikel voor alle kandidaatstoffen gebruikt waardoor het aantal groepen gereduceerd wordt.

Verfijning

Door een diermodel te gebruiken dat aansluit bij voorgaande en geplande studies met dezelfde kandidaatstof en bij de eisen van de wetgever aan onderzoek aan potentiële geneesmiddelen, en natuurlijk de mogelijkheid biedt om relevante parameters voor de hersenfysiologie van de mens te meten wordt per studie dat diermodel gekozen dat het meest verfijnd antwoord kan geven op de onderzoeksvraag. Het onderzoek in deze aanvraag is gericht op geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel. Aangezien deze ziekten de bloed-hersenbarrière kunnen aantasten komen in bepaalde gevallen de meest relevante data uit transgene of chemisch geïnduceerde diermodellen voor deze ziekten (zie bijlage 1.3.2).

Microdialyse is ook een verfijnde methode omdat na de implantatie van de probes herhaalde monsters uit een anderszins slecht bereikbaar orgaan als de hersenen genomen kunnen worden zonder het dier te storen. Gedurende het hele experiment worden de dieren gemonitord op tekenen van ongerief. Alle handelingen aan de dieren, waaronder operaties, hanteren, monitoren, monsterafname, en termineren worden volgens vaststaande protocollen uitgevoerd door bevoegde en goed getrainde medewerkers.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Pijn, lijden en angst worden bij de dieren geminimaliseerd door:

- 1) Passende huisvesting met kooiverrijking. Wanneer groepshuisvesting niet mogelijk is door de aanwezigheid van externe delen van implantaten die kunnen worden aangevreten, maken we gebruik van sociale individuele huisvestingskooien. Deze kooien hebben een geperforeerde perspex scheidingswand die alle interacties behalve fysieke mogelijk maakt voor de dieren. Oppervlakte per dier voldoet aan de Europese richtlijn.
- 2) Gebruik van passende anesthesie en analgesie tijdens invasieve ingrepen.
- 3) Na de operatie worden alle dieren minimaal eenmaal per dag (tweemaal op werkdagen) gemonitord voor wondgenezing, algemeen herstel na operatie, gewicht van het dier, algemene uiterlijke kenmerken duidend op ongerief (pijn, lijden of angst). Bijzonderheden worden vastgelegd in het welzijnsdagboek.
- 4) Monitoring van gewicht van het dier en andere algemene uiterlijke kenmerken duidend op ongerief in de periode vanaf toediening tot het einde van de monsterverzameling. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de bovengenoemde beslisboom (SOP Animal discomfort and humane endpoints).

In het geval dat een dier onverwachte tekenen van ongerief vertoont die duiden op bijvoorbeeld pijn, lijden of angst, zullen de symptomen door het biotechnisch team en een artikel 9 onderzoeker beoordeeld worden. Indien nodig wordt ook advies van een dierenarts ingewonnen. Dit kan leiden tot het termineren van het betreffende dier op grond van humane eindpunten en eventueel tot stopzetting van de studie.

Milieueffecten: n.v.t.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Aangezien het gaat om nieuwe potentiële geneesmiddelen is de kans op herhaling zeer klein, navraag bij de klant over eerdere *in vivo* experimenten met de kandidaatstof moet deze kans verder uitsluiten (study information data sheet). Wanneer gebruik wordt gemaakt van een referentiestof (bijv. gold standard of bekende (ant)agonist van een receptor om het werkingsmechanisme van de kandidaatstof te bepalen) kan het voorkomen dat een stof toegediend wordt die al eerder getest is in proefdieren, en waarvan de werking al bekend is. Herhaling is in dat geval noodzakelijk om het effect van de kandidaatstof te kunnen vergelijken met dat van een stof met een bekend effect. Waar mogelijk zal het aantal dieren in de referentiegroep minder zijn dan in de experimentele groepen.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Dieren worden voor aanvang van het experiment standaard gehuisvest volgens de richtlijnen 2010/63/EU. In bijzondere gevallen, waar bijvoorbeeld gevochten wordt binnen een kooi, kan ervoor gekozen worden om de dieren in kleinere groepen of individueel te huisvesten. Na de operatie moeten de dieren individueel gehuisvest worden om beschadigingen van de operatiewond, probe(s) en/of katheter en/of canule, en daardoor uitval uit het experiment, te vermijden. Ook tijdens de microdialyse moeten de dieren alleen zitten. Bij veel experimenten vindt de microdialyse op de dag na de operatie (met overnacht herstel) plaats. In deze gevallen duurt de solitaire huisvesting doorgaans tussen de 24 en 36 uur (afhankelijk van het individuele tijdstip van operatie en de duur van het microdialyse-experiment. In de experimentele kooien kunnen de dieren elkaar goed horen, zien en ruiken. Bij experimenten waar de microdialyse niet op de eerste of tweede dag na de operatie plaatsvindt (bijv. met (sub)chronische doseringen) worden de dieren na de operatie zoveel mogelijk gehuisvest in de eerder genoemde speciale kooien met een tussenwand, waarbij de dieren maximaal interactie kunnen hebben met uitzondering van direct fysiek contact. In ieder geval worden kooien met individueel gehuisveste dieren zodanig geplaatst dat de dieren elkaar kunnen horen, zien en ruiken.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De operatie voor het inbrengen van de microdialyseprobe(s) en eventueel katheter en/of canule, die onder diepe algehele anesthesie plaatsvindt, is invasief en bij ontwaken na de operatie kunnen dieren hiervan ongerief ervaren, net als door het ontwaken uit de anesthesie zelf. Vooral het verwijderen van de periost en de incisie van de (hoofd)huid veroorzaken pijn bij de dieren. Pijnbestrijding vindt plaats door toediening van een systemisch analgeticum voor aanvang van de operatieve ingreep en topicale anestheticum op de plaats van de operatieve ingreep.

Indien van toepassing wordt optimale pijnbestrijding na de operatie gecontroleerd op basis van uiterlijk en gedrag van de dieren. Bij langer durende operaties kunnen de dieren waar nodig worden behandeld met een aanvullende dosis analgeticum. Bij nieuwe operatietechnieken/ -gebieden zal voor het einde van de lichtfase op de dag van de operatie ook een tweede dosis analgeticum gegeven worden. Op basis van observaties wordt bij de standaard microdialyseprobe-implantaties extra pijnstilling alleen gegeven als uiterlijk en gedrag van het dier daar aanleiding toe geeft, op basis van de interne SOP.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Bijkomen uit anesthesie is een bekende oorzaak van stress voor de dieren, de uitgevoerde operatie kan ook een rol spelen.
2. Tijdens de experimenten zelf worden de dieren individueel gehuisvest om te voorkomen dat zij elkaars implantaten of chirurgische wonden beschadigen bij sociale interacties. Individuele huisvesting is een bekende vorm van verminderd dierenwelzijn en moet zo beperkt mogelijk worden ingezet.
3. De andere bron van potentiële welzijnsaantasting zijn de te testen kandidaatstoffen, deze kunnen ondanks eerdere (veelal in vitro) testen nog onbekende bijwerkingen vertonen.
4. Bij gebruik van oudere dieren is het ook van belang om rekening te houden met leeftijdsspecifieke aantasting van het welzijn (bijvoorbeeld (maar niet uitsluitend) het ontstaan van gezwellen in oudere dieren).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Oorzaken voor ongerief bij bijkomen uit anesthesie zijn gerelateerd aan de tijdelijk veranderde fysiologie van het lichaam, het lichaam heeft minimaal een aantal uren nodig om de homeostase te herstellen.
2. Het knagen aan implantaten en onderling vechten hebben te maken met normaal sociaal gedrag van de dieren, dit is moeilijk anders tegen te gaan dan door individuele huisvesting.
3. Oorzaak voor het onbekend zijn van mogelijke bijwerkingen is dat de stoffen die getest zullen worden zich vaak nog in een vroeg stadium van de geneesmiddelenontwikkeling bevinden en daarom vaak nog niet eerder (uitgebreid) in dieren getest zijn. Hierdoor kan het zijn dat er onverwachte negatieve bijwerkingen optreden. Indien een stof in onze studies ernstige bijwerkingen vertoont, wordt deze uiteraard niet toegelaten tot verdere testen.
4. Bij gebruik van oudere dieren: specifiek ongerief heeft meestal te maken met symptomen die ook bij oudere mensen worden waargenomen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

1. Om het ongerief bij het bijkomen uit anesthesie te minimaliseren komen de dieren bij in een rustige en verwarmde omgeving waar ze toegang hebben tot voedsel en water. De dieren krijgen voor de operatie een pijnstillertoegevend. De dieren worden regelmatig gecontroleerd tot ze fit genoeg zijn om in hun experimentele kooi te worden geplaatst.

2. Dieren in (sub)chronische experimenten worden gehuisvest in een speciaal ontworpen sociale "individual-group-housing-cage". Deze huisvesting behoudt olfactorische, auditieve en visuele interacties aangaan, maar beperkt fysiek contact. Daarnaast wordt altijd kooiverrijking aangeboden aan de dieren.
3. Negatieve effecten veroorzaakt door de kandidaatstof worden op vier manieren geminimaliseerd:
 - a) Voorafgaand aan het opzetten van het experimentele ontwerp wordt informatie van de klant gevraagd om zoveel mogelijk over de kandidaatstof te weten te komen. Dit is inclusief informatie die kan wijzen op het ontstaan van potentieel ongerief bij de dieren. Dit wordt verwerkt in de SIDS (study information data sheet)
 - b) Tijdens de experimenten worden de dieren geobserveerd voor tekenen van ongerief en onbedoelde bijwerkingen. Hierbij wordt het dierenwelzijn ingeschat met behulp van de interne beslisboom (SOP Animal discomfort and humane endpoints). Wanneer noodzakelijk en zinvol zal extra verzorging en/of additionele analgesie worden toegepast.
 - c) In het geval dat er effecten optreden die niet zijn voorzien en/of zijn beschreven in de beslisboom wordt in overleg met de IvD en dierenarts gekeken naar mogelijkheden om het ongerief te verminderen, of indien nodig de dieren te termineren.
 - d) Door een goed experimenteel ontwerp kan ervoor worden gezorgd dat niet alle dieren gelijktijdig worden ingezet bij aanvang van de studie (randomisatie, pilot-experimenten, versprongen toediening).
4. Bij gebruik van oudere dieren: de noodzaak van inzet van deze dieren wordt vooraf in detail met de sponsor besproken. Het gedrag van de dieren wordt tijdens en voor experimenten geobserveerd om vroegtijdig te kunnen ingrijpen bij eventueel ongerief.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tijdens de operatie: bij niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, of sterke bloedingen, wordt een humaan eindpunt toegepast.

Na de operatie en tijdens het experiment wordt een humaan eindpunt toegepast bij:

- het loskomen van probes, katheter of canule (tevens wetenschappelijk eindpunt);
- meerdere convulsies;
- gewichtsverlies (algemeen meer dan 15% gewichtsverlies, vlak na de operatie 20%);
- algehele slechte conditie van het dier na operatie: combinatie van meerdere symptomen (op basis van parameters zoals vacht (zeer dof en ruw), veranderde oogkleur of huidskleur, lokale ontsteking, lichaamstemperatuur (met de hand voelbaar verhoogd of laag)).

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

0-5%

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongerief classificatie:

Onder narcose brengen (licht)

Inbrengen van de probe(s) of guide-canule(s) en evt. katheter en/of canule (licht)

Bijkomen uit algehele narcose (matig)

Postoperatieve pijn en ongemak (matig)

Postoperatieve individuele huisvesting (licht bij acute experimenten, ook licht bij langetermijnexperimenten door speciale kooien met een geperforeerde tussenwand)

Het eventueel inzetten/vervangen van probes, onderhoud en testen van CSF-canule of katheter (licht)

Aansluiten van het dier aan de microperfusiepomp en evt. het bloedmonsterafnamesysteem (licht)

Toedienen van de experimentele stof (licht)

Toedienen van een barbituraat bij termineren (licht)

Cumulatief is het ongerief in deze experimenten voor alle dieren als matig in te schatten.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Voor het verifiëren van de juiste plaatsing van de microdialyseprobe(s) is het noodzakelijk om na afloop van de microdialyse de hersenen uit de dieren te halen. Dit is niet verenigbaar met het in leven houden van de dieren na afloop van de proef.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
4. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

5.1 lid2h

- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.

Volgnummer	Type dierproef
2	Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

In experimenten uitgevoerd onder deze bijlage worden dezelfde experimentele handelingen als in bijlage 1.3.1 uitgevoerd maar dan met diermodellen voor een CNS-gerelateerde aandoening. De hier aangevraagde experimenten zijn erop gericht om in vivo informatie over de biologische distributie/kinetiek en de farmacodynamiek van potentiële geneesmiddelen te verkrijgen. Deze informatie wordt gebruikt om de selectie van kandidaten te ondersteunen voor verdere ontwikkeling tot een geneesmiddel tegen een ziekte van het CNS. Aangezien deze ziektes de bloed-hersenbarrière kunnen aantasten is het in bepaalde gevallen noodzakelijk om gebruik te maken van transgene of chemisch geïnduceerde diermodellen voor deze ziektes.

Als een klant ons vraagt een studie in een ziektemodel uit te voeren én

- a) er voldoende kennis over PK en PD in wildtypedieren vergaard is (hetzij door studies door de onderzoeker zelf, hetzij door studies door / in opdracht van de klant) en
- b) deze waarden zodanig zijn dat het kandidaatgeneesmiddel verder ontwikkeld kan worden, en
- c) het potentiële geneesmiddel gericht is tegen een ziekte waarvoor in de gebruikte species rat of muis een goed gekarakteriseerd ziektemodel beschikbaar is, en
- d) redelijkerwijs te verwachten is dat PK en/of PD in de patiënt en het ziektemodel af zou kunnen wijken van die in het gezonde organisme, en
- e) we het ongerief van de te testen dieren in kunnen schatten, en
- f) de voorgestelde studie binnen vergunning past;

Dan kan een studie in een relevant ziektemodel gepland en uitgevoerd worden om hierin de farmacokinetiek (distributie) en farmacodynamiek (effecten) te bepalen.

Experimentele aanpak

Om later herhaald monsters te kunnen nemen uit een of meerdere hersengebieden, cerebrospinale vloeistof (CSF) en/of bloed worden dieren tijdens een operatie voorzien van (een) microdialyseprobe(s), dan wel guide-canule(s), met eventueel een canule in de cisterna magna en/of katheter in de vena jugularis/femoralis.

Daarnaast worden kandidaatstoffen toegediend om hun farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen te kunnen bepalen. Toediening geschiedt afhankelijk van de eigenschappen van de kandidaatstof en de vraagstelling van de klant bijvoorbeeld *per os*, intraveneus, intraperitoneaal of intracisterna-magna en, ook weer afhankelijk van de eigenschappen van de kandidaatstof en de vraagstelling, eenmalig of (sub-)chronisch.

Na de implantatie kunnen vanaf de volgende dag gedurende meerdere uren (tot dagen) monsters verzameld worden zonder dat de dieren veel gestoord worden. Daarna worden primaire uitkomstparameters *ex vivo* veelal met behulp van massaspectrometrie of ELISA bepaald.

Primaire uitkomstparameters

- Farmacokinetiek van de kandidaatstof: aanwezigheid (kwalitatief) en concentratie (kwantitatief) in vloeistofmonsters uit (verschillende) targetersengebied(en), CSF, en/of bloed over de tijd na toediening van de kandidaatstof.
- Farmacodynamiek van de kandidaatstof: concentratie van biomarkers in (verschillende) targetersengebied(en) over de tijd, in reactie op de toediening van kandidaatstof(fen).
-

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Tijdens het onderzoek kunnen de volgende handelingen worden uitgevoerd (* voor optionele handelingen):

• Acclimatisatiefase:

Na aankomst in het vivarium krijgen de dieren de tijd om gewend te raken aan hun nieuwe kooi, voeding en andere omgevingsfactoren. Dit bevordert zowel het dierenwelzijn als de reproduceerbaarheid van experimentele resultaten. De acclimatisatiefase duurt minimaal 7 dagen.

• Voedselrestrictie *:

Het kan in een enkel geval voorkomen dat de dieren bij orale toediening van de kandidaatstof "nuchter" moeten zijn. In deze gevallen zullen de dieren gedurende maximaal 8 uur voor toediening gevast worden. Aangezien de meeste toedieningen in de ochtend plaatsvinden, en de microdialyse daaropvolgend gedurende de dag, zal deze voedselrestrictie in de actieve periode van de dieren plaatsvinden. Er is gekozen voor een maximum van 8 uur omdat een vastenperiode van 6 tot 7 uur bij ratten en muizen vaak resulteert in een vergelijkbare maaglediging als bij langere vastenperiodes (bv. Prior et al., 2012; Hauff & Nebendahl, 2017). Hierbij wordt alleen het voer weggenomen, de dieren hebben *ad libitum* toegang tot drinkwater. Dit is, net als bij al toegelaten geneesmiddelen, afhankelijk van stofs specifieke eigenschappen en gebeurt alleen als er al gegevens over de kandidaatstof bekend zijn dat dit voor opname van de stof noodzakelijk is. Ter indicatie, in het verleden betrof dit hooguit 1 of 2 studies per periode van 5 jaar. De verwachting is dus, dat voedselrestrictie hoogstens maar bij enkele studies nodig zal zijn.

• Implantatie van microdialyseprobe(s) met of zonder cisterna magna canule en/of vena jugularis/femoralis katheter

Voor het uitvoeren van een microdialyse-experiment worden één of meerdere probes chirurgisch in de hersenen aangebracht. Het plaatsen van de probes vindt altijd onder diepe (inhalatie) anesthesie plaats, in combinatie met een systemisch analgeticum en topicale anesthesie, op een verwarmde ondergrond en met individuele temperatuurcontrole indien de te verwachten operatieduur meer dan 30 minuten is.

Afhankelijk van de vraagstelling wordt de meest geschikte probe gekozen:

- de conventionele probe, geschikt voor collectie van neurotransmitters en "small molecules",
- de metaquant probe, waarmee absolute concentraties van stoffen kunnen worden bepaald (veel gebruikt voor de PK van kandidaatstoffen),

- de push-pull probe, deze is door zijn poriegrootte zeer geschikt voor het bemonsteren van grotere (eiwit) biomarkers en "large molecules"

De coördinaten voor de plaatsing van de probe(s) worden vooraf bepaald op basis van het te bemonsteren hersengebied met behulp van een relevante stereotactische hersen-atlas:

- Paxinos G. and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, compact 6th edition, 2009

- Franklin K.B.J. and Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, compact 3rd edition, 2008

- a) Boven het doelgebied in de hersenen wordt een zo klein mogelijk incisie gemaakt in de hoofdhuid.
- b) Topicaal anestheticum wordt aangebracht, inwerktijd ca. 5 minuten.
- c) Periost wordt verwijderd.
- d) Met een trepaanboor worden verdiepingen in de schedel geboord waar schroefjes in gezet kunnen worden waaraan (zie h) de probe kan worden vastgezet.
- e) Met een trepaanboor wordt een gaatje door de dorsale zijde van de schedel geboord, boven het hersengebied.
- f) De meninges worden voorzichtig met de tip van een naald geopend.
- g) Met behulp van een stereotactisch frame wordt een microdialyseprobe (of een "guide-canule", een speciaal hiervoor ontworpen houder, met daarin een probe of een stilet; in het geval van herhaalde, langdurige, of uitgestelde microdialyse) exact boven het hersengebied gepositioneerd en langzaam in de hersenen naar binnen gebracht met een vloeiende draaibeweging van de micromanipulator op de stereotact.
- h) De probe of guide-canule wordt met schroefjes en een speciaal biocompatibel polymeer vastgezet op de schedel.

Wanneer het nodig is om stofconcentraties in de verschillende compartimenten (bloed, hersenen, CSF) te bepalen wordt tijdens dezelfde operatie een katheter of canule aangelegd in de bloedbaan of de cisterna magna.

- Voor het nemen van bloedmonsters (of bloeddialysaatmonsters) wordt de katheter geplaatst in de vena jugularis of de vena femoralis. Het uiteinde van de katheter wordt op de schedel bevestigd op vergelijkbare wijze als bij de microdialyseprobes.

- Voor het nemen van CSF-monsters wordt een canule geplaatst in de cisterna magna, op dezelfde wijze als de plaatsing van microdialyseprobes.

Na plaatsing van de probe(s) en eventueel katheter en/of canule (implantaten) wordt de incisie gesloten, waarna de dieren rustig kunnen bijkomen van de anesthesie. Afhankelijk van het aantal te plaatsen implantaten duurt de operatie per dier tussen 20 en 90 minuten. Tijdens de recovery worden de dieren warm gehouden door middel van een warmtematje en gemonitord. Wanneer de dieren volledig wakker zijn, worden ze individueel in experimentele kooien gehuisvest om beschadiging van elkaars operatiewond of implantaten te voorkomen. Waar mogelijk worden de dieren zodanig gehuisvest dat ze elkaar kunnen horen, zien, en ruiken; bij langer durende individuele huisvesting is dat tot de overbrenging in experimentele kooien zoveel mogelijk per paar in een kooi met een geperforeerde perspex scheidingswand voor beperkt contact zonder dat de implantaten kunnen worden beschadigd en daardoor het experiment gevaar kan lopen.

• **Extra behandeling bij induceerbare modellen: inductie van het ziektemodel ***

Verschillende ziektemodellen worden geïnduceerd in gezonde wildtypedieren. Hierbij is de inductie een extra behandeling.

- Bij experimentele auto-immune encephalomyelitis (EAE), model voor de demyeliniserende ziekte multiple sclerose, worden de dieren op twee verschillende plekken subcutaan geïnjecteerd en 1-6 uur later en 24 uur later nog een keer intraperitoneaal. Dit is een totaal van 4 injecties.

Bij 6-OHDA-laesie van dopaminerge neuronen wordt het neurotoxine 6-hydroxydopamine tijdens een stereotactische operatie (zie hierboven) m.b.v. een Hamilton-spuit geïnjecteerd in een hersengebied met dopaminerge neuronen. Anesthesie en analgesie als bij de stereotactische operatie.

• **Toediening van kandidaatstof, vehikel, en/of referentiestof:**

Het individuele dier wordt één of meerdere keren (maximaal 60 keer in totaal, bijv. 2 maanden dagelijks, of

1 maand tweemaal daags) een dosering van de teststof(fen) (kandidaatstof of vehikel, en/of referentiestof) toegediend. Als naast de kandidaatstof ook een bekende receptor (ant)agonist als referentiestof toegediend wordt, kan hiermee ook informatie over het werkingsmechanisme van de kandidaatstof verkregen worden. De volgende toedieningsroutes worden (in overleg met de klant over de geschiktheid/toepasbaarheid voor de specifieke vraagstelling en eigenschappen van de kandidaatstof) **bij voorkeur** gebruikt:

- Onverdoofd: intraperitoneaal, subcutaan, oraal (per gavage of in het dieet), intraveneus (eventueel via geplaatste katheter), lokaal door de microdialyseprobe (alleen van toepassing bij PD).

Daarnaast kan, indien de al bekende eigenschappen van de kandidaatstof hiertoe aanleiding geven, gebruik worden gemaakt van:

- Onverdoofd: intramusculair, rectaal, intranasaal.

- Onder anesthesie (bij voorkeur worden deze administraties gedaan tijdens de bovenbeschreven operatie, en zullen vooral relevant zijn voor biological kandidaatstoffen zoals AAV-virussen en antisense oligonucleotiden): intracerebroventriculair, intracerebraal, intrathecaal, toedieningen in specifieke organen (zoals bijvoorbeeld intracardiaal).

De keuze voor de toedieningsroute vindt voor iedere studie in de planningsfase plaats, waarna de onderzoeksopzet aan de IvD wordt voorgelegd. Mocht in een studie een gekozen toedieningsroute ontoereikend of ongeschikt blijken (bv. onvoldoende recovery van de kandidaatstof in de offline analyse van de microdialysemonsters na een PK-studie), dan kan in overleg met de klant besloten worden dat de onderzoeker een vervolgstudie ontwerpt met een andere toedieningsroute, die vanzelfsprekend ook weer aan de IvD wordt voorgelegd.

Waar van toepassing worden richtlijnen voor administratie uit de literatuur gebruikt, bijvoorbeeld "Handboek proefdierkunde" door L.F.M. van Zutphen (2009), Diehl et al (Journal of Applied Toxicology (2001) 21:15-23). Toedieningstechnieken worden uitgevoerd volgens gestandaardiseerde en getrainde werkinstructies.

Veelal zal de toediening van de kandidaatstof(fen), referentiestof(fen) of vehikel na een aantal basale monsters tijdens de microdialyse plaatsvinden om pre- met postdoseringsmonsters te kunnen vergelijken. Bij (sub)chronische toediening of als sprake is van langetermijneffecten kan toediening ook al voor de implantatie van de microdialyseprobe(s) aanvangen.

De toediening zal in de meeste gevallen in de eerste uren van de lichtfase plaatsvinden. Indien de activiteit van het dier bepalend is voor de neurofysiologie van het mechanisme waar de kandidaatstof op aangrijpt en dus de transleerbaarheid naar de mens volgens ons in het gedrang komt, hebben we de mogelijkheid het dag-nacht-ritme van de dieren om te keren. In overleg met de klant beslist de onderzoeker over de noodzakelijkheid hiervan.

• **Klinische observaties**

Na de operatie en na toediening van stoffen worden de dieren geobserveerd. Hierbij wordt gekeken naar algemene klinische verschijnselen die op effecten van de toediening van de stof en/of verminderd welzijn kunnen duiden. De dieren worden beoordeeld aan de hand van de door de IvD opgestelde beslisboom in de interne SOP Animal discomfort and humane endpoints. Bevindingen worden vastgelegd in het welzijnsdagboek van ieder individueel dier en de studie-overview.

• **Microdialyse**

16 tot 18 uur na afloop van de operatie is de bloed-hersenbarrière gesloten, wordt geen interferentie meer verwacht en kan de microdialyse gestart worden. Bij de dieren in de experimentele kooien worden de geïmplanteerde microdialyseprobes via slangetjes met een microperfusiepomp buiten de kooi verbonden. Tijdens het bemonsteren stroomt een iso-osmotische vloeistof door de probe, met een snelheid van 0,1 tot enkele microliters per minuut. De uitstromende vloeistof uit de outletslangetjes wordt per dier en per hersengebied opgevangen om tot bijv. 10-, 15-, 30-, 60-, of 240-minutenmonsters te komen. De bemonsteringssnelheid is afhankelijk van de vraagstelling van de klant en van de al bekende eigenschappen van de kandidaatstoffen. Voordat de experimentele monsters verzameld worden, is er een stabilisatiefase van 1,5 tot 2 uur, waarin de dieren wennen aan de slangetjes en de niveaus van biomarkers in de opgevangen monsters stabiliseren. Over het algemeen worden eerst alle monsters verzameld en opgeslagen en vervolgens met behulp van bijvoorbeeld high-performance liquid chromatography (HPLC) gevolgd door tandem-massaspectrometrie geanalyseerd. Zodra de probe op de microperfusiepomp is aangesloten, moet

continu worden geperfuseerd met de iso-osmotische vloeistof om dezelfde probe te kunnen blijven gebruiken. Daarom wordt in sommige gevallen in plaats van de probe zelf een zogenaamde guide-canule geïmplant. Door een guide-canule kan (door weefselschade en activatie van microglia) maximaal tweemaal hetzelfde hersengebied met een nieuwe probe gedurende 24 uur worden bemonsterd. Kort voor de eigenlijke microdialyse (meestal 1 dag ervoor) wordt bij het wakkere dier een precies passende microdialyseprobe in de guide-canule geplaatst. (1) Als herhaald bemonsterd moet worden, bijvoorbeeld aan het begin en einde van een (sub)chronische toediening van kandidaatstof, kan de probe na de eerste microdialyse-sessie vervangen worden door een stilet, die weer vlak voor de tweede microdialyse-sessie door een nieuwe microdialyseprobe vervangen wordt. (2) Ook als de microdialyse pas verschillende dagen tot weken na de implantatie plaatsvindt, is de implantatie van een guide-canule (met stilet die kort van tevoren vervangen wordt door de eigenlijke probe) de aangewezen manier om tot betrouwbare bemonstering te komen. (3) Als gedurende meer dan 30 uur onafgebroken moet worden bemonsterd, is het ook zekerder om een guide-canule te implanteren, zodat als een probe na zo lange tijd eventueel verstopt raakt, deze vervangen kan worden en daarmee het betrokken dier niet voortijdig getermineerd zou moeten worden.

Bij sommige studies wordt tijdens de microdialyse ook bloed en/of CSF verzameld (zie navolgende punten).

- **Verzameling bloedmonsters ***

Bloedafname voor en/of na toediening van de kandidaatstof gebeurt via de staartvene (voorkeur bij rat), aangezichtsvene (voorkeur bij muis), en bij herhaaldelijke monsterafname door de geplaatste katheter in de vena jugularis/femoralis. De afname van bloedmonsters is bij voorkeur beperkt tot maximaal 8 monsters van in totaal 10% van het totaal bloedvolume per 24 uur en tot een absoluut maximum van 15% van het totaal bloedvolume in 24 uur, waarbij boven de 10% vervangende vloeistof (fysiologische zoutoplossing) wordt gegeven volgens een interne SOP en met de klant wordt gesproken over de noodzaak van de overschrijding van 10% van het bloedvolume. Een absoluut maximum van 20%, met vervangende vloeistof, kan alleen verdeeld over verschillende dagen afgenomen worden. Eventuele herstelperiodes zijn 7 dagen voor 7,5 tot 10%, 14 dagen voor 10 tot 15% en 21 dagen voor 15 tot 20%. Vanwege de veelal korte experimenten zal er na het afnemen van deze volumina vaker sprake zijn van termineren dan van herstel. Als leidraad voor de interne SOP is gekeken naar Diehl (2001), deze geeft in tabel 4 aan dat bij meerdere monsternames tot 20% kan worden afgenomen in 24h met 3 weken herstel. Samengevat richten wij ons dus op een maximum van 10% van het totaal bloedvolume, wanneer dit wordt overschreden wordt met de klant gesproken over de noodzaak van grotere volumina. Wanneer deze noodzaak aantoonbaar is, is 20% de uiterlijke bovengrens. Bij een afname van boven de 10% wordt vervangende vloeistof (fysiologische zoutoplossing) gegeven.

- **Verzameling cerebrospinale vloeistof ***

Indien nodig kunnen in de periode na toediening ook CSF-monsters worden verzameld om farmacokinetische en farmacodynamische parameters te bestuderen. Deze monsters worden genomen door de geplaatste canule in de cisterna magna. De afname van CSF-monsters is beperkt tot 4 monsters van 7-10 µl van een muis en 8 monsters van 10-20 µl van een rat per 24 uur. Door de CSF-productie van 0.3 µl per minuut in de muis en meer bij grotere diersoorten wordt de afgenomen vloeistof ruimschoots weer aangevuld (Pardridge, Expert Opin Drug Deliv 2016: 13, 963-975).

Terminatie

Aan het eind van het experiment zullen de dieren onder inhalatie-anesthesie worden getermineerd met een barbituraat, zodat de hersenen kunnen worden verwijderd om de plaatsing van de probe(s) te verifiëren. Dit gebeurt op een wijze in overeenstemming met bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Tevens kan er weefsel, terminaal bloed, en/of terminaal CSF worden uitgenomen voor verdere *ex vivo* bepalingen. In enkele gevallen, wanneer post-mortem weefsel zonder bloed moet worden uitgenomen, kan transcaderiale perfusie onder inhalatie-anesthesie onderdeel uitmaken van het terminatieprotocol.

De gebruikte methoden voor implantatie, toediening, monsterafname, anesthesie, euthanasie, bloed-CSF, uitname van hersen- en ander weefsel zijn gedocumenteerd in standaardprocedures.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot

een minimum te beperken.

Het aantal dieren dat nodig is voor een experiment is afhankelijk van de vraagstelling en de uiteindelijk te bepalen uitkomstparameter(s). Op basis van een statistische poweranalyse is in het verleden de benodigde groepsgrootte voor de verschillende typen experimenten berekend. Dit loopt uiteen van 4 tot 16 dieren per dosering (afhankelijk van de variatie in de concentratie van de te bepalen biomarker of kandidaatstof, hierbij is ook het te bemonsteren hersengebied van belang, en wordt getoetst met een poweranalyse).

- Voor farmacokinetische studies met behulp van een ultra langzame flow (in onze gepatenteerde metaquant) zijn minimaal data van 4 dieren nodig, in combinatie met bloed- en CSF-afname adviseren wij de klant een aantal van 5 dieren.

- Voor de klassieke neurotransmitters (monoamines en aminozuren) zijn 5 tot 6 dieren per dosering voldoende.

- Voor neurotransmitters waarvan bekend is dat basale concentraties sterk variëren, zoals histamine en acetylcholine, zijn 7 tot 8 dieren nodig.

- Voor studies aan metabolieten van de kynurenine-pathway zijn 7 tot 8 dieren nodig.

- Voor studies aan eiwitten zijn 8 tot 12 dieren nodig.

- Wanneer voor de navolgende analyse(s) veel plasma of CSF moet worden verzameld, kan bij muizen de groepsgrootte oplopen tot 16 dieren.

- Voor niet eerder geteste biomarkers zal eerst op basis van een pilotstudie de bioanalytische variatie moeten worden bepaald om de groepsgrootte voor een volledige studie te kunnen bepalen. Hierbij wordt voor t-tests, bijvoorbeeld bij het vergelijken van area-under-the-curve (AUC), een poweranalyse volgens <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html> gebruikt met een alfa van 0,05 en een power (1-beta) van 0,8. Voor gecompliceerdere experimenten, zoals repeated measures ANOVA, gebruiken we ook de online beschikbare software G*Power (<https://www.psychologie.hhu.de/arbeitsgruppen/allgemeine-psychologie-und-arbeitspsychologie/gpower.html>).

Het aantal groepen in een experiment wordt geminimaliseerd door het studie-ontwerp goed op te zetten:

- Doseringen worden gekozen op basis van de voorhanden zijnde informatie over de kandidaatstof. Voor de bepaling van farmacokinetiek is niet altijd een controlegroep (vehikel) nodig.

- Tijdstippen goed kiezen, zodat er zo min mogelijk monsters hoeven worden verzameld, maar wel alle relevante tijdstippen meegenomen worden op basis van kennis over de werking van de kandidaatstof en het moleculaire target.

- Goede randomisatie, waar mogelijk blinderen van de experimentator, gebruik van pilotgroepen en toedieningen bij verschillende dieren verspreid over de dag, waardoor bij eventuele negatieve gevolgen voor het dierwelzijn tijdig ingegrepen kan worden en eventueel de experimentele opzet herzien.

Ons streven is altijd om betrouwbare resultaten te vinden met gebruik van zo min mogelijk dieren.

Het aantal benodigde dieren in deze bijlage wordt tot een minimum beperkt door in studies uit bijlage 1.3.1 eerst de PK en PD van de kandidaatstof in gezonde dieren te bepalen.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoorten

Onze instelling heeft expertise in het toepassen van de microdialysetechniek in muizen en ratten. De experimenten in deze bijlage worden uitsluitend met relevante ziektemodellen uitgevoerd. Voor de verschillende onderzoeken wordt per klant en per studie bepaald welk ziektemodel het meest geschikt is voor het beantwoorden van de specifieke vraag, gecombineerd met het minste te verwachten lijden (in aantal en individueel ongerief).

Herkomst

Alle dieren zullen worden verkregen van erkende instellingen voor het fokken van proefdieren.

Geslacht en levensstadium

Deze experimenten kunnen zowel in mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd worden. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de klant het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide

geslachten benadrukt. Desondanks zien we dat het merendeel van de gebruikte dieren nog steeds mannelijk zijn. Voor de klant is het vaak belangrijk om de vergelijkbaarheid met eventueel voorafgaand uitgevoerde *in vivo* studies of opvolgende *in vivo* studies veilig te stellen. De klant zal in dat geval moeten aangeven dat een specifiek geslacht passender is in het totale ontwikkelingstraject.

In de meeste studies worden (jong)volwassen dieren ingezet. Vaak is dat voor de klant een relevante leeftijd. Verder zijn de stereotactische operaties die wij uitvoeren bijv. qua coördinaten voor volwassen dieren geoptimaliseerd. Ook is er bij volwassen dieren meer ruimte op de schedel om de verschillende probes vast te zetten, waardoor bij meerdere meetgebieden het aantal dieren zo laag mogelijk gehouden kan worden. Daarom vinden de implantaties bij voorkeur bij (jong)volwassen dieren plaats, vanaf een leeftijd van 8 weken, bij een gewicht van 250-350 gram voor ratten en 20-25 gram voor muizen. Wanneer dat voor de studie-opzet noodzakelijk is, kunnen dieren tot maximaal 18 maanden geopereerd worden, met bij ratten aangepaste coördinaten volgens Tabel 1 in de bovengenoemde hersenatlas.

Om aan veroudering gerelateerde ziektes te bestuderen worden soms ook oudere dieren ingezet, of juist pasgeboren dieren wanneer het gaat om een genetische afwijking die vanaf de eerste levensdagen moet worden bestreden met een passende therapie. In dat laatste geval zal het dan gaan om toediening op of vanaf de vroeg postnatale leeftijd, terwijl de probe-implantatie en de daaropvolgende microdialyse in het (jong)volwassen dier zullen plaatsvinden. In het intakeformulier voor een studie (study information data sheet, SIDS) wordt de klant specifiek gevraagd de keuze voor het diertype, leeftijd en geslacht te motiveren. Waar nodig wordt de klant naar de motivatie voor zijn keuze gevraagd en bij zijn keuze geadviseerd.

Ziektemodellen

Relevante ziektemodellen zijn veelal voor neurodegeneratieve ziektes. Dieren uit deze modellen ontwikkelen, net als patiënten met deze ziektes, symptomen als progressieve motorische beperkingen, veranderde activiteit, en gewichtsafname. De dieren worden vanaf het moment van aankomst in ons vivarium dan wel vanaf inductie van het ziektemodel dagelijks gemonitord en wekelijks gewogen. Bij gemeten gewichtsafname kan ervoor gekozen worden om vaker te wegen. Toetsing van het intrinsieke ongerief zal gebeuren door de IvD, waar nodig met ondersteuning van experts die bekend zijn met het model.

Ziekten waarvoor met enige regelmaat modellen ingezet zijn, en naar verwachting ingezet zullen worden:

• Ziekte van Alzheimer

- 5xFAD Tg muis (amyloid). Deze GGO-muis heeft hersenspecifieke overexpressie (via Thy1-promoter) van 5 Familial Alzheimer's Disease (FAD) mutaties: humaan amyloid beta precursor proteïne met 3 FAD-mutaties en humaan presenilin-1 met 2 FAD-mutaties, en is daarmee een model voor amyloid-pathologie bij de ziekte van Alzheimer. Vanaf ongeveer 2 maanden treden amyloid plaques en neurodegeneratie op. Vanaf 4-5 maanden vertonen de dieren een verslechterd ruimtelijk werkgeheugen en verminderd angstgedrag. Lager lichaamsgewicht en motorische zwakte treden pas later op, tussen 6 en 9 maanden, terwijl exploratief gedrag tot minstens 12 maanden normaal lijkt. Cognitieve symptomen doen zich voor vanaf 3-6 maanden en worden sterker bij het ouder worden. Deze dieren worden beoordeeld naar de algemene interne beslisboom dierenwelzijn. Het verwachte ongerief is afhankelijk van de leeftijd van de dieren (zie Tabel 1). Op welke leeftijd de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch).
- Tg(tauP301L)4510 muis. Deze GGO-muis heeft hersenspecifieke overexpressie (via Thy1-promoter) van humaan tau-eiwit met de P301L-mutatie. Deze dieren ontwikkelen vanaf 6 maanden neurofibrillaire tangles. Motorsymptomen zijn vrij subtiel, maar de gemiddelde levensduur is minder dan 12 maanden. Alzheimer-achtige symptomen ontwikkelen zich vanaf 5-6 maanden. Deze dieren worden beoordeeld aan de hand van een interne modelspecifieke beslisboom. Het verwachte ongerief is afhankelijk van de leeftijd van de dieren (zie Tabel 1). Op welke leeftijd de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch).

- **Ziekte van Huntington**

- Q175 KI muis. In deze GGO-muis is exon 1 van het Huntingtin (htt) gen vervangen door een humaan exon 1 met 180-220 CAG-herhalingen. Deze dieren vertonen Huntington-achtige symptomen vanaf rond 36 weken (naar eigen ervaring niet voor 20 weken), hoewel vanaf 2 maanden al subtiel verminderde gewichtstoename en activiteit (in de donkerfase) ten opzichte van wildtypedieren gezien zijn. Duidelijkere motorische symptomen, met tremors, lagere activiteit, hunching, piloerectie en afnemend lichaamsgewicht (voornamelijk mannelijke dieren) en lagere lichaamstemperatuur treden pas later op. In dit model wordt weinig claspings gezien en sterfte treedt bij deze lijn pas na ruim een jaar op. Deze dieren worden beoordeeld aan de hand van een modelspecifieke beslisboom. Het verwachte ongerief is afhankelijk van de leeftijd van de dieren (zie Tabel 1). Op welke leeftijd de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch). Wij gebruiken bij voorkeur deze muis en niet de veelgebruikte R6/2, omdat daar het ziekteverloop erg zwaar en snel is.
- R6/2 muis. Deze GGO-muis heeft een overexpressie van het humane Huntingtin (htt) gen met ongeveer 120 CAG-herhalingen. Deze dieren vertonen Huntington-achtige symptomen die vanaf een maand kunnen optreden en sterker zijn dan bij de Q175-lijn. Dieren ontwikkelen motorische symptomen, vaak beginnend met claspings. Verder treden tremoren op, chorea-achtige bewegingen, afnemend lichaamsgewicht en epileptische aanvallen. Sterfte treedt op vanaf 3 maanden en de meeste dieren sterven voordat ze 4 maanden oud zijn. Deze dieren worden beoordeeld aan de hand van een modelspecifieke beslisboom. Het verwachte ongerief is afhankelijk van de leeftijd van de dieren (zie Tabel 1). Op welke leeftijd de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch), maar dieren uit dit model zullen niet na 13 weken getest worden.

- **Ziekte van Parkinson**

- mThy1-hSNCA, line 15 muis. Deze GGO-muis heeft een overexpressie van wildtype humaan α -synucleïne. De eerste Parkinson-achtige symptomen treden op vanaf ongeveer 2 maanden en de dieren worden beoordeeld naar de algemene interne beslisboom dierenwelzijn. Het verwachte ongerief is afhankelijk van de leeftijd van de dieren (zie Tabel 1). Op welke leeftijd de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch).
- Parkin KO rat. Deze GGO-rat heeft een prematuur stopcodon in het Parkin-gen, en daardoor geen functioneel eiwit. Deze dieren hebben veranderingen in dopaminerge signaalwegen vanaf 2 maanden, zonder neurodegeneratie tot minstens 8 maanden, en met maar kleine motorische afwijkingen tot minstens 8 maanden. De dieren worden beoordeeld naar de algemene interne beslisboom dierenwelzijn. Het verwachte ongerief is afhankelijk van de leeftijd van de dieren (zie Tabel 1). Op welke leeftijd de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch).
- Rat of muis met 6-OHDA-laesie. Dit is een chemisch geïnduceerd Parkinsonmodel. Door de unilaterale injectie (zie boven) van 6-OHDA ontstaat er een (partiële) laesie van de dopaminerge neuronen en treden snel na de operatie Parkinson-achtige symptomen op. Direct na de operatie vertonen de dieren unilateraal draaigedrag (richting afhankelijk van de zijde van injectie), afgenomen motor-activiteit en verminderd eet- en drinkgedrag. Een belangrijk welzijns criterium dat moet worden bijgehouden is daarom het gewicht van de dieren. Voor muizen licht het humane eindpunt daarbij bij een gewichtsverlies van 20%, bij ratten is dat 15% gewichtsverlies. De dieren worden beoordeeld aan de hand van een modelspecifieke beslisboom. Het verwachte ongerief is beschreven in Tabel 1. In welk stadium de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch).

- **Multiple Sclerose: EAE-model in rat en muis**

- Door de injecties (zie boven) van een antigen-emulsie en pertussistoxine ontstaat actieve

immunisatie en daardoor experimentele auto-immune encephalomyelitis (EAE) en demyelinisatie. Hoewel het precieze verloop symptomen van dier tot dier verschilt, beginnen de EAE-symptomen vaak tussen 9 en 14 dagen na immunisatie, met een maximum in de symptomen rond 3 tot 5 dagen na de eerste symptomen. Deze piek duurt 1 tot 3 dagen waarna vaak gedeeltelijk herstel optreedt. Voor dit model is een vijfpunts-scoremodel gangbaar en ook aanbevolen door producenten van de te injecteren antigenen. Humane eindpunten zijn daarin aangegeven en zullen worden opgevolgd: 0, geen symptomen; 1, slappe staart; 2, gedeeltelijke verlamming van de achterpoten; 3, complete verlamming van de achterpoten; 4, 3 met gedeeltelijke verlamming van de voorpoten; 5, stervende, gestorven of getermineerd. Halve punten zijn ook mogelijk en beschreven. Het verwachte ongerief is ook beschreven in Tabel 1. Dit model wordt vanwege het betrouwbaardere en meer homogene optreden van symptomen over het algemeen in vrouwelijke dieren geïnduceerd. Leeftijd bij inductie: 9-14 weken. In welk stadium na de inductie de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof: vanaf de immunisatie voor profylactische effecten, vanaf het punt dat 10-20% van de dieren symptomen vertoont (semi-therapeutisch), individueel vanaf het tijdstip van de eerste symptomen (therapeutisch), of laat therapeutisch vanaf een vooraf bepaald aantal dagen na het optreden van de eerste symptomen.

In het geval een klant een studie wil laten uitvoeren met een ander model dan de hierboven genoemde modellen, zullen eventueel ook andere sterk gelijkende modellen ingezet kunnen worden, in overleg met de IvD. In het geval van nieuwe modellen zullen we, na overleg met de IvD, een melding of aanvraag tot wijziging indienen.

Geschatte aantallen

In de laatste ~40 studies, uitgevoerd onder projectvergunning AVD **5.1 lid2h** 015341, is gewerkt met een groepsgrootte van 4-20 (gemiddeld 6), aantal groepen 1-8 (gemiddeld 3), en tussen 3 en 100 (gemiddeld 18-20) dieren per studie, waarvan 40% muizen en 60% ratten. Op basis daarvan is de volgende schatting gemaakt; bij 40 studies per jaar zijn dat maximaal 750 dieren per jaar, dus 3750 over een periode van 5 jaar voor de gehele projectaanvraag.

Gebaseerd op het gebruik van rond de 20% ziektemodellen van het totaal aantal dieren in de afgelopen jaren in projectvergunning AVD **5.1 lid2h** 015341, zijn de **geschatte aantallen voor deze bijlage: 300 muizen en 450 ratten (40% en 60% van totaal 750 dieren).**

Tabel 1: Samenvatting van de naar verwachting in te zetten ziektemodellen, hun intrinsieke ongerief op verschillende leeftijden, en het te verwachten cumulatieve ongerief in een experiment. Deze tabel fungeert als richtlijn voor onderzoeker en IvD, er zijn gevallen denkbaar dat het daadwerkelijke ongerief anders wordt ingeschat.

ziekte	model	intrinsiek ongerief op leeftijd		specifieke symptomen	cumulatief ongerief			referenties
					1 implantaat	2 implantaten	3-4 implantaten	
Alzheimer	5xFAD muis	2 mnd	geen-licht	-	matig	matig	n.v.t.	Jawhar et al., 2012; Oakley et al., 2006
		5 mnd	licht-matig	geheugen (-), angst (-)	matig	matig	n.v.t.	
		8 mnd	matig-ernstig	motoriek (-), gewicht (-)	matig-ernstig	ernstig	n.v.t.	
	Tg(tauP301L)4510 muis	2 mnd	geen-licht	-	matig	matig	n.v.t.	Dutschmann et al., 2010
		5 mnd	matig	gewicht (-), activiteit (-), motoriek (-), claspig (+)	matig	matig	n.v.t.	
		8 mnd	matig-ernstig	hunching (+), problemen met de bovenste luchtwegen	matig-ernstig	ernstig	n.v.t.	
Huntington	R6/2 muis	1 mnd	geen-licht	-	matig	matig	n.v.t.	Mangiarini et al., 1996
		2 mnd	matig-ernstig	motoriek (-), gewicht (-), tremors, claspig, chorea, epilepsie	matig-ernstig	ernstig	n.v.t.	
		5 mnd	n.v.t.	mortaliteit	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	
	Q175 KI muis	2 mnd	geen-licht	gewichtstoename (-), activiteit (-)	matig	matig	n.v.t.	Menalled et al., 2012
		5 mnd	licht-matig	motoriek (-), gewicht (-)	matig	matig	n.v.t.	
		8 mnd	matig-ernstig	motoriek (-), activiteit (-), gewicht (-), tremors, hunching	matig-ernstig	ernstig	n.v.t.	
Multiple Sclerose	EAE, 9-14 wk inductie, in rat of muis	1-8d na inductie	geen-licht	-	matig	matig	rat: matig	Thakker et al., 2007
		9-14d na inductie	licht-matig	slappe staart, zwakke achterpoten	matig	matig	rat: matig-ernstig	
		3-5d later	matig-ernstig	verlamming achter- en dan voorpoten	matig-ernstig	muis: ernstig rat: matig-ernstig	rat: ernstig	
Parkinson	mThy1-hSNCA, line 15 muis	2 mnd	licht	gewichtstoename (-), activiteit (-), motoriek (-)	matig	matig	n.v.t.	Choi et al., 2020; Fleming et al., 2004
		5 mnd	licht-matig	gewichtstoename (-), activiteit (-), motoriek (-)	matig	matig	n.v.t.	
		8 mnd	matig	gewichtstoename (-), activiteit (-), motoriek (-)	matig	matig-ernstig	n.v.t.	
	Parkin KO rat	2 mnd	geen-licht	-	matig	matig	matig	Dave et al., 2014
		5 mnd	licht	kleine motorische afwijkingen	matig	matig	matig	
		8 mnd	matig	kleine motorische afwijkingen	matig	matig	matig-ernstig	
	6-OHDA laesie in rat of muis	na inductie	matig	unilateraal draaien, motoriek (-), gewicht (-)	matig	matig	rat: matig-ernstig	Boix et al., 2018

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

De vergunninghoudende instelling is actief betrokken bij het Nederlandse 3R-research centrum en heeft regelmatig contact met wereldwijde regelgevende instanties en het FELASA netwerk (Federation of European Lab Animal Science).

In het licht van de NCad-richtlijn 'Transitie naar proefdier-vrij onderzoek' worden studieontwerpen regelmatig herzien (in combinatie met veranderende richtlijnen of aanbevelingen) en op ad-hoc basis (in samenwerking met de klant) om beschikbare verfijningen op te nemen, om het aantal dieren te minimaliseren of de ernst van het ongemak te verminderen. Het bedrijf is actief betrokken bij sector-overschrijdende initiatieven, gericht op het toepassen van de 3V's.

Vervanging

Op dit moment bestaat er geen goed geïsoleerd systeem waarmee de hersenen in al hun complexiteit en samenspel met andere organen kunnen worden bestudeerd. Vervanging van deze experimenten is daardoor slechts ten dele mogelijk. Het testen van een potentieel geneesmiddel moet uiteindelijk altijd gebeuren in een intact organisme, zodat de volledige fysiologie en ook potentiële bijwerkingen kunnen worden vastgesteld. De kinetiek van farmaca wordt in grote mate bepaald door de doorbloeding van de organen, bovendien kan het zijn dat de kandidaatstof in het lichaam een secundair (off-target) effect heeft, waardoor de *in vitro* gemeten reactie *in vivo* niet plaatsvindt of wordt geremd of juist versterkt. Alleen kandidaatstoffen die in *in vitro* testen veelbelovend zijn, worden ingezet in dierproeven. Wel bestaan er plannen om in de nabije toekomst hersen-organoïden te gaan kweken en te testen of deze bij onze studies gebruikt kunnen worden. Dit is een interessante ontwikkeling maar nog in een vroeg stadium. Uiteindelijk hopen we hiermee een deel van de dierexperimenten te kunnen vervangen. Immers, de organoïden kunnen een goed model zijn voor de hersenen, maar (nog) niet voor het geheel van lichaam en hersenen en de bloed-hersenbarrière.

Vermindering

Allereerst wordt het aantal te gebruiken dieren verminderd doordat kandidaatstoffen voordat ze in dieren getest worden, eerst *in vitro* gekarakteriseerd, veelal bij de klant of bij andere [5.1 lid 2a](#). Zonder deze gegevens wordt een stof niet aan een dier toegediend. Om het gedrag van de te testen kandidaatstof (potentiële geneesmiddel) in het gekozen bemonsteringssysteem (microdialyseprobes) en de meetbaarheid met de *ex vivo* meetmethodes (veelal massaspectrometrie) te bepalen, wordt bij microdialyse ten behoeve van PK eerst een *in vitro* microdialyse doorgevoerd alvorens de kandidaatstof in dieren te testen.

In vergelijking tot methoden waarbij op elk tijdstip dieren moeten worden getermineerd om hersenextracten te prepareren zijn er bij de microdialysetechniek veel minder dieren nodig om op verschillende tijdstippen gegevens te verzamelen over de biodistributie (PK) en/of effecten (PD) van een kandidaatstof. Als PK en PD binnen één studie gecombineerd gemeten kunnen worden (niet altijd mogelijk vanwege bijv. verschillende probe-eigenschappen, of niet wenselijk vanwege bijv. eerst dosisbepaling), vermindert het aantal proefdieren dat nodig is in de preklinische fase nog sterker. Deze strategie biedt tevens het voordeel dat de aan elkaar verbonden data (uit hetzelfde dier) betere informatie leveren dan wanneer de data uit verschillende dieren zouden worden verzameld. Door verder ontwikkeling van de post

mortem offline analysemethodes kunnen steeds meer analyten per monster gemeten worden, waardoor het aantal benodigde dieren verder vermindert. Ook zijn de operatietechnieken verder ontwikkeld waardoor meer probes per dier geïmplanteerd kunnen worden.

Bij de opzet van elke studie worden de groepen en groepsgroottes, te bemonsteren hersengebieden en eventuele andere monsters, kandidaatstofconcentraties en doseringsschema's zorgvuldig gekozen om uit zo min mogelijk dieren alle benodigde informatie te verkrijgen. Door in het experimenteel ontwerp randomisatie, pilotgroepen en verspringende administraties toe te passen, is het vaak mogelijk om eventuele uitval op te vangen zonder dat we monsters missen voor bepaalde tijdstippen. Waar mogelijk wordt bij studies met meerdere kandidaatstoffen hetzelfde vehikel voor alle kandidaatstoffen gebruikt waardoor het aantal groepen gereduceerd wordt.

Verfijning

Door een diermodel te gebruiken dat aansluit bij voorgaande en geplande studies met dezelfde kandidaatstof en bij de eisen van de wetgever aan onderzoek aan potentiële geneesmiddelen, en natuurlijk de mogelijkheid biedt om relevante parameters voor de hersenfysiologie van de mens te meten wordt per studie dat diermodel gekozen dat het meest verfijnd antwoord kan geven op de onderzoeksvraag. Het onderzoek in deze aanvraag is gericht op geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel. Aangezien deze ziekten de bloed-hersenbarrière kunnen aantasten komen in bepaalde gevallen de meest relevante data uit transgene of chemisch geïnduceerde diermodellen voor deze ziekten (zie bijlage 1.3.2).

Microdialyse is ook een verfijnde methode omdat na de implantatie van de probes herhaalde monsters uit een anderszins slecht bereikbaar orgaan als de hersenen genomen kunnen worden zonder het dier te storen. Gedurende het hele experiment worden de dieren gemonitord op tekenen van ongerief. Alle handelingen aan de dieren, waaronder operaties, hanteren, monitoren, monsterafname, en termineren worden volgens vaststaande protocollen uitgevoerd door bevoegde en goed getrainde medewerkers.

Specifiek voor de studies in deze bijlage is dat er eerst zowel onderzoek naar *in vitro* eigenschappen gedaan moet zijn als *in vivo* farmacokinetiek en farmacodynamiek in gezonde dieren (bijv. in studies uit bijlage 1.3.1), alvorens ziektemodellen ingezet worden.

Het onderzoek in deze aanvraag is gericht op geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel. Aangezien deze ziekten bijvoorbeeld de bloed-hersenbarrière kunnen aantasten of de werkzaamheid van een kandidaatstof alleen vastgesteld in een ziek systeem vastgesteld kan worden, zijn transgene of chemisch geïnduceerde diermodellen voor deze ziekten soms het meest verfijnde model om de verdeling en ook de werkzaamheid van potentiële geneesmiddelen te onderzoeken.

Aangezien bij deze ziektemodellen intrinsiek ongerief op kan treden, analoog aan de symptomen bij patiënten met dezelfde ziekte, wordt extra gelet op tekenen van ongerief bij de dieren en waar nodig extra verzorging gegeven. Per ziektemodel is (of wordt) er een interne scorelijst/beslisboom opgesteld in samenspraak met de IvD en waar nodig ondersteund door experts die bekend zijn met het model.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Pijn, lijden en angst worden bij de dieren geminimaliseerd door:

- 1) Passende huisvesting met kooiverrijking. Wanneer groepshuisvesting niet mogelijk is door de aanwezigheid van externe delen van implantaten die kunnen worden aangevreten, maken we gebruik van sociale individuele huisvestingskooien. Deze kooien hebben een geperforeerde perspex scheidingswand die alle interacties behalve fysieke mogelijk maakt voor de dieren. Oppervlakte per dier voldoet aan de Europese richtlijn.
- 2) Gebruik van passende anesthesie en analgesie tijdens invasieve ingrepen.
- 3) Na de operatie worden alle dieren minimaal eenmaal per dag (tweemaal op werkdagen) gemonitord voor wondgenezing, algemeen herstel na operatie, gewicht van het dier, algemene uiterlijke kenmerken duidend op ongerief (pijn, lijden of angst). Bijzonderheden worden vastgelegd in het welzijnsdagboek.
- 4) Monitoring van gewicht van het dier en andere algemene uiterlijke kenmerken duidend op ongerief in de periode vanaf toediening tot het einde van de monsterverzameling. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de bovengenoemde beslisboom (SOP Animal discomfort and humane endpoints).

In het geval dat een dier onverwachte tekenen van ongerief vertoont die duiden op bijvoorbeeld pijn, lijden of angst, zullen de symptomen door het biotechnisch team en een artikel 9 onderzoeker beoordeeld worden. Indien nodig wordt ook advies van een dierenarts ingewonnen. Dit kan leiden tot het termineren van het betreffende dier op grond van humane eindpunten en eventueel tot stopzetting van de studie.

Pijn, lijden en angst specifiek voor de te gebruiken ziektemodellen worden gemonitord volgens scorelijsten en beslisbomen die vooraf voor elk model opgesteld worden en met de IvD afgestemd. De experimenten aan deze ziektemodellen worden (voor zover de onderzoeksvraag dat toelaat) zoveel mogelijk voordat ernstige fenotypen optreden uitgevoerd.

Milieueffecten: n.v.t.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Aangezien het gaat om nieuwe potentiële geneesmiddelen is de kans op herhaling zeer klein, navraag bij de klant over eerdere *in vivo* experimenten met de kandidaatstof moet deze kans verder uitsluiten (study information data sheet). Wanneer gebruik wordt gemaakt van een referentiestof (bijv. gold standard of bekende (ant)agonist van een receptor om het werkingsmechanisme van de kandidaatstof te bepalen) kan het voorkomen dat een stof toegediend wordt die al eerder getest is in proefdieren, en waarvan de werking al bekend is. Herhaling is in dat geval noodzakelijk om het effect van de kandidaatstof te kunnen vergelijken met dat van een stof met een bekend effect. Waar mogelijk zal het aantal dieren in de referentiegroep minder zijn dan in de experimentele groepen.

Aangezien we als voorwaarde voor het uitvoeren van experimenten volgens deze bijlage (met ziektemodellen) stellen dat er voldoende kennis over PK en PD in wildtypedieren vergaard is (zie boven bij 2A), zullen in onder deze projectvergunning of elders dezelfde kandidaatstoffen al eens aan wildtypedieren toegediend zijn. Omdat het in deze bijlage de specifieke eigenschappen en effecten van/op PK en PD in het ziektemodel betreft, is dit geen herhaling.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Dieren worden voor aanvang van het experiment standaard gehuisvest volgens de richtlijnen 2010/63/EU. In bijzondere gevallen, waar bijvoorbeeld gevochten wordt binnen een kooi, kan ervoor gekozen worden om de dieren in kleinere groepen of individueel te huisvesten. Na de operatie moeten de dieren individueel gehuisvest worden om beschadigingen van de operatiewond, probe(s) en/of katheter en/of canule, en daardoor uitval uit het experiment, te vermijden. Ook tijdens de microdialyse moeten de dieren alleen zitten. Bij veel experimenten vindt de microdialyse op de dag na de operatie (met overnacht herstel) plaats. In deze gevallen duurt de solitaire huisvesting doorgaans tussen de 24 en 36 uur (afhankelijk van het individuele tijdstip van operatie en de duur van het microdialyse-experiment. In de experimentele kooien kunnen de dieren elkaar goed horen, zien en ruiken. Bij experimenten waar de microdialyse niet op de eerste of tweede dag na de operatie plaatsvindt (bijv. met (sub)chronische doseringen) worden de dieren na de operatie zoveel mogelijk gehuisvest in de eerder genoemde speciale kooien met een tussenwand, waarbij de dieren maximaal interactie kunnen hebben met uitzondering van direct fysiek contact. In ieder geval worden kooien met individueel gehuisveste dieren zodanig geplaatst dat de dieren elkaar kunnen horen, zien en ruiken.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De operatie voor het inbrengen van de microdialyseprobe(s) en eventueel katheter en/of canule, die onder diepe algehele anesthesie plaatsvindt, is invasief en bij ontwaken na de operatie kunnen dieren hiervan ongerief ervaren, net als door het ontwaken uit de anesthesie zelf. Vooral het verwijderen van de periost en de incisie van de (hoofd)huid veroorzaken pijn bij de dieren. Pijnbestrijding vindt plaats door toediening van een systemisch analgeticum voor aanvang van de operatieve ingreep en topicale anestheticum op de plaats van de operatieve ingreep.

Indien van toepassing wordt optimale pijnbestrijding na de operatie gecontroleerd op basis van uiterlijk en gedrag van de dieren. Bij langer durende operaties kunnen de dieren waar nodig worden behandeld met een aanvullende dosis analgeticum. Bij nieuwe operatietechnieken / -gebieden zal voor het einde van de lichtfase op de dag van de operatie ook een tweede dosis analgeticum gegeven worden. Op basis van observaties wordt bij de standaard microdialyseprobe-implantaties extra pijnstilling alleen gegeven als uiterlijk en gedrag van het dier daar aanleiding toe geeft, op basis van de interne SOP.

Voor de beschreven ziektemodellen is het niet gebruikelijk om extra pijnstilling te gebruiken. Bij ernstig ongerief (wat zoals in Tabel 1 en bij K. beschreven wordt bij bepaalde combinaties van diermodellen en experimentele opzet kan optreden) is bij overschrijding van de vooraf bepaalde criteria voor de symptomen de toepassing van een humaan eindpunt geïndiceerd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Bijkomen uit anesthesie is een bekende oorzaak van stress voor de dieren, de uitgevoerde operatie kan ook een rol spelen.
2. Tijdens de experimenten zelf worden de dieren individueel gehuisvest om te voorkomen dat zij elkaars implantaten of chirurgische wonden beschadigen bij sociale interacties. Individuele huisvesting is een bekende vorm van verminderd dierenwelzijn en moet zo beperkt mogelijk worden ingezet.
3. De andere bron van potentiële welzijnsaantasting zijn de te testen kandidaatstoffen, deze kunnen ondanks eerdere (veelal in vitro) testen nog onbekende bijwerkingen vertonen.
4. Bij gebruik van oudere dieren is het ook van belang om rekening te houden met leeftijdsspecifieke aantasting van het welzijn (bijvoorbeeld (maar niet uitsluitend) het ontstaan van gezwellen in oudere

dieren).

Daarbij kunnen de (zieke) dieren last hebben van modelspecifieke symptomen. Symptomen en het ingeschatte ongerief zijn daarbij analoog aan die bij patiënten met dezelfde ziekte. Daar het hier ziekten van het centraal zenuwstelsel betreft zijn de symptomen vaak verbonden met veranderde cognitie, emotie, locomotie, slaapregulatie en voedselinname. Voor een inschatting per ziektemodel en leeftijd, zie Tabel 1.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Om de farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van een potentieel geneesmiddel in humane patiënten te voorspellen is een diermodel met dezelfde fysiologie het beste model. De dieren uit deze ziektemodellen hebben vaak soortgelijke symptomen als de humane patiënten.

De oorzaken van het algemene ongerief dat door de experimentele opzet bij alle dieren kan ontstaan:

1. Oorzaken voor ongerief bij bijkomen uit anesthesie zijn gerelateerd aan de tijdelijk veranderde fysiologie van het lichaam, het lichaam heeft minimaal een aantal uren nodig om de homeostase te herstellen.
2. Het knagen aan implantaten en onderling vechten hebben te maken met normaal sociaal gedrag van de dieren, dit is moeilijk anders tegen te gaan dan door individuele huisvesting.
3. Oorzaak voor het onbekend zijn van mogelijke bijwerkingen is dat de stoffen die getest zullen worden zich vaak nog in een vroeg stadium van de geneesmiddelenontwikkeling bevinden en daarom vaak nog niet eerder (uitgebreid) in dieren getest zijn. Hierdoor kan het zijn dat er onverwachte negatieve bijwerkingen optreden. Indien een stof in onze studies ernstige bijwerkingen vertoont, wordt deze uiteraard niet toegelaten tot verdere testen.
4. Bij gebruik van oudere dieren: specifiek ongerief heeft meestal te maken met symptomen die ook bij oudere mensen worden waargenomen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Om het ongerief door de modelspecifieke symptomen te minimaliseren worden waar mogelijk de experimenten op een zo vroeg mogelijk tijdstip in de ontwikkeling van de ziekte uitgevoerd. Vooral bij de neurodegeneratieve ziektemodellen is dit relevant. Daarbij is het vaak wel noodzakelijk om in deze studies daadwerkelijk in dieren met symptomen te testen. Als de dieren (nog) geen afwijkende fysiologie (bijv. bloed-hersenbarrière) ten opzichte van gezonde dieren vertonen, is de meerwaarde van het ziektemodel beperkt. Daarom wordt voor iedere studie en elke kandidaatstof zorgvuldig afgewogen (onderzoeker met klant en IvD) in welk stadium van de ziekte de studie plaats moet vinden en duidelijk afgesproken wat de humane eindpunten zijn. Daarbij is ook van belang of de door de klant ontwikkelde kandidaatstof voor een bepaald stadium van de ziekte ontwikkeld is, bijvoorbeeld of die een profylactisch of therapeutisch effect heeft.

Vanaf aankomst van de transgene dieren dan wel de inductie van het ziektemodel worden de dieren dagelijks gemonitord op modelspecifieke tekenen van ongerief. Bij het optreden van modelspecifieke symptomen treedt de interne beslisboom in werking en wordt de vooraf vastgelegde extra verzorging toegepast.

De maatregelen tegen het algemene ongerief dat door de experimentele opzet bij alle dieren kan ontstaan:

1. Om het ongerief bij het bijkomen uit anesthesie te minimaliseren komen de dieren bij in een rustige en verwarmde omgeving waar ze toegang hebben tot voedsel en water. De dieren krijgen voor de operatie een pijnstillertoezegging. De dieren worden regelmatig gecontroleerd tot ze fit genoeg zijn om in hun experimentele kooi te worden geplaatst.
2. Dieren in (sub)chronische experimenten worden gehuisvest in een speciaal ontworpen sociale "individual-group-housing-cage". Deze huisvesting behoudt olfactorische, auditieve en visuele interacties aangaan, maar beperkt fysiek contact. Daarnaast wordt altijd kooiverrijking aangeboden aan de dieren.
3. Negatieve effecten veroorzaakt door de kandidaatstof worden op vier manieren geminimaliseerd:
 - a) Voorafgaand aan het opzetten van het experimentele ontwerp wordt informatie van de klant gevraagd om zoveel mogelijk over de kandidaatstof te weten te komen. Dit is inclusief informatie die kan wijzen op het ontstaan van potentieel ongerief bij de dieren. Dit wordt verwerkt in de SIDS (study information data sheet)

b) Tijdens de experimenten worden de dieren geobserveerd voor tekenen van ongerief en onbedoelde bijwerkingen. Hierbij wordt het dierenwelzijn ingeschat met behulp van de interne beslisboom (SOP Animal discomfort and humane endpoints). Wanneer noodzakelijk en zinvol zal extra verzorging en/of additionele analgesie worden toegepast.

c) In het geval dat er effecten optreden die niet zijn voorzien en/of zijn beschreven in de beslisboom wordt in overleg met de IvD en dierenarts gekeken naar mogelijkheden om het ongerief te verminderen, of indien nodig de dieren te termineren.

d) Door een goed experimenteel ontwerp kan ervoor worden gezorgd dat niet alle dieren gelijktijdig worden ingezet bij aanvang van de studie (randomisatie, pilot-experimenten, versprongen toediening).

4. Bij gebruik van oudere dieren: de noodzaak van inzet van deze dieren wordt vooraf in detail met de sponsor besproken. Het gedrag van de dieren wordt tijdens en voor experimenten geobserveerd om vroegtijdig te kunnen ingrijpen bij eventueel ongerief.

5.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tijdens de operatie: bij niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, of sterke bloedingen, wordt een humaan eindpunt toegepast.

Na de operatie en tijdens het experiment wordt een humaan eindpunt toegepast bij:

- het loskomen van probes, katheter of canule (tevens wetenschappelijk eindpunt);
- meerdere convulsies;
- gewichtsverlies (algemeen meer dan 15% gewichtsverlies, vlak na de operatie 20%);

Bij algehele slechte conditie van het dier na operatie: combinatie van meerdere symptomen (op basis van parameters zoals vacht (zeer dof en ruw), veranderde oogkleur of huidskleur, lokale ontsteking, lichaamstemperatuur (met de hand voelbaar verhoogd of laag)), zonder de bovengenoemde indicaties voor een humaan eindpunt, kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast.

Voor de verschillende ziektemodellen zijn additioneel aangepaste eindpunten vastgelegd in zowel de algemene SOP "animal discomfort and humane endpoints" als in modelspecifieke werkinstructies. Het is voor onze studies van belang dat de symptomen niet zo ernstig zijn dat de hele fysiologie van het dier aangetast is. Experimenten worden daarom zoveel mogelijk vroeg in het ziekteproces uitgevoerd en afgesloten. Voor de verschillende ziektemodellen hebben we de volgende humane eindpunten vastgelegd. Als de specifieke studie vroegere effecten van het ziektemodel onderzoekt, kan het wetenschappelijke eindpunt ook al eerder liggen.

- **5xFAD Tg muis:**

- Ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek* tot complete immobiliteit, of
- Gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.
- Bij een combinatie van gewichtsverlies minder dan 15% met matige problemen in de motoriek kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast.

- **Tg(tauP301L)4510 muis:**

- Ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek* tot complete immobiliteit, of
- Gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.
- Bij een combinatie van verschillende van de volgende symptomen kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast: gewichtsverlies minder dan 15%, matige problemen in de motoriek, bovenste luchtweg dysfunctie.

- **Q175 KI muis:**
 - Complete immobiliteit of het ontbreken van de omdraaireflex bij het plaatsen van het dier op de rug, of
 - Bij de combinatie van 2 van de volgende symptomen: ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek, onafgebroken stereotype gedragingen, steeds herhalende convulsies, gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.
 - Bij een combinatie van verschillende van de volgende symptomen kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast: gewichtsverlies minder dan 15%, matige problemen in de motoriek, stereotype gedragingen met tussenpozen, een enkele korte convulsie, dysmetrie, chorea, diskinesie van de ledematen, grijpkrachtverlies.

- **R6/2 muis:**
 - Complete immobiliteit of het ontbreken van de omdraaireflex bij het plaatsen van het dier op de rug, of
 - Bij de combinatie van 2 van de volgende symptomen: ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek, onafgebroken stereotype gedragingen, steeds herhalende convulsies, gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie, of
 - Leeftijd van 13 weken.
 - Bij een combinatie van verschillende van de volgende symptomen kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast: gewichtsverlies minder dan 15%, matige problemen in de motoriek, stereotype gedragingen met tussenpozen, een enkele korte convulsie, dysmetrie, chorea, diskinesie van de ledematen, grijpkrachtverlies.

- **mThy1-hSNCA, line 15 muis:**
 - Ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek* tot complete immobiliteit, of
 - Gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.
 - Bij een combinatie van gewichtsverlies minder dan 15% met matige problemen in de motoriek kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast.

- **Parkin KO rat:**
 - Ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek* tot complete immobiliteit, of
 - Gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.
 - Bij een combinatie van gewichtsverlies minder dan 15% met matige problemen in de motoriek kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast.

- **Rat of muis met 6-OHDA-laesie:**
 - Ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek* tot complete immobiliteit, of
 - Extreem draaigedrag rond de gehele lichaamsas, of
 - Gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.
 - Bij een combinatie van verschillende van de volgende symptomen kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast: gewichtsverlies minder dan 15%, matige problemen in de motoriek, loopstoornis, hunching, prolaps van de penis, intrekken van de flanken.

- **EAE-model in rat en muis:**
 - Hooke score 4: complete verlamming van de achterpoten met gedeeltelijke verlamming van de voorpoten, of
 - Gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.

* Alleen indien het experimentele protocol een specifiek symptoom beschrijft als verwacht voor het model en de experimentele procedure, kan met specifieke toestemming van de IvD een experiment uitgevoerd worden met een dier met dit symptoom.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

5-10%

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongerief classificatie:

Intrinsiek ongerief door het ziektemodel geen tot ernstig*: geen ongerief 5-10%, licht ongerief 25-30%, matig ongerief 50-60%, ernstig ongerief 10-15%, zie bij 2.B. en Tabel 1 voor de verschillende modellen afzonderlijk.

* Dit zijn de getallen als we van een gelijkmatige verdeling van alle modellen, leeftijden, en stadia uitgaan. In de praktijk verwachten we dat het ongerief lager uit zal vallen omdat we hier uitgaan van het maximum.

Onder narcose brengen (licht)

Inbrengen van de probe(s) of guide-canule(s) en evt. katheter en/of canule (licht)

Bijkomen uit algehele narcose (matig)

Postoperatieve pijn en ongemak (matig)

Postoperatieve individuele huisvesting (licht bij acute experimenten, ook licht bij langetermijnexperimenten door speciale kooien met een geperforeerde tussenwand)

Het eventueel inzetten/vervangen van probes, onderhoud en testen van CSF-canule of katheter (licht)

Aansluiten van het dier aan de microperfusiepomp en evt. het bloedmonsterafnamesysteem (licht)

Toedienen van de experimentele stof (licht)

Toedienen van een barbituraat bij termineren (licht)

Cumulatief is het ongerief in deze experimenten als matig tot ernstig in te schatten*:

Matig: 80%

Ernstig: 20%

* Dit zijn de getallen als we van een gelijkmatige verdeling van alle modellen, leeftijden, en stadia uitgaan. In de praktijk verwachten we dat het ongerief lager uit zal vallen omdat we hier uitgaan van het maximum.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Voor het verifiëren van de juiste plaatsing van de microdialyseprobe(s) is het noodzakelijk om na afloop van de microdialyse de hersenen uit de dieren te halen. Dit is niet verenigbaar met het in leven houden van de dieren na afloop van de proef.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Ontwikkeling van geneesmiddelen tegen hersenziekten met behulp van microdialyse
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Microdialyse, Farmacokinetiek, Farmacodynamiek, Translationeel geneesmiddelenonderzoek, Centraal zenuwstelsel

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Ziekten van het centraal zenuwstelsel, zoals multiple sclerose of de ziekte van Parkinson of Alzheimer, hebben een grote impact op de maatschappij. Ontwikkeling en markttoelating van nieuwe geneesmiddelen is dus nodig. Het doel van dit project is om in levende dieren met behulp van microdialyse (en vaak additionele afname van ruggemergvocht- en/of bloedmonsters) de verdeling en de werkzaamheid te bepalen van potentiële nieuwe geneesmiddelen die gericht zijn tegen hersenziekten. Microdialyse werkt met een katheter in de hersenen, die voorzien is van een heel fijn filter om stoffen uit de hersenen op te kunnen nemen zonder vloeistof uit de hersenen te halen.
---	--

- | | |
|---|---|
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Dit project zal bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen tegen hersenziekten. De microdialysetechniek is geschikt om zowel de concentratie van een toegediende stof als de concentratie van lichaamseigen signaalstoffen betrokken bij de ziekteprocessen te meten. Deze informatie is van belang als eerste stap in de uiteindelijke toelating van nieuwe geneesmiddelen op de markt. Door dit onderzoek kan het daaropvolgende en voor registratie wettelijk vereist onderzoek doelgerichter en met minder dieren worden uitgevoerd. |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Maximaal 3750 dieren (1500 muizen en 2250 ratten). Maximaal 750 daarvan (300 muizen en 450 ratten) zijn dieren die symptomen van bepaalde hersenziekten kunnen vertonen (ziektomodellen). |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | <p>De dieren ondergaan een operatie voor het inbrengen van één of meerdere katheters voor de monsterafname. Na het herstel zijn er geen negatieve gevolgen voor het welzijn van het dier door de aanwezigheid van de implantaten. Wel moeten de dieren, om de implantaten zoveel mogelijk intact te houden, na de operatie individueel gehuisvest worden.</p> <p>Na toediening kunnen er bijwerkingen van de te testen kandidaatstoffen optreden. Deze kunnen ongerief voor de knaagdieren veroorzaken.</p> <p>Tijdens de microdialyse worden soms ook bloed- of ruggemergvochtmonsters afgenomen. Bij (herhaaldelijke) afname door een geïmplanteerde katheter hebben de dieren hier weinig last van, bij bloedafname zonder katheter kan licht ongerief optreden.</p> <p>Bij een klein deel van de experimenten zal gebruik worden gemaakt van diermodellen voor de hersenziekten waartegen de kandidaatstoffen getest worden (maximaal 20% van de dieren). Deze dieren kunnen last hebben van symptomen die lijken op die van patiënten met de hersenziekte. Daarom wordt voor elk ziektemodel apart een inschatting van het ongerief gemaakt.</p> |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | <p>De totale belasting per dier wordt als volgt ingeschat:</p> <ul style="list-style-type: none"> - voor de wildtype/gezonde dieren:
matig ongerief 100% - voor de ziektemodellen (maximaal 750 dieren):
matig ongerief 80%,
ernstig ongerief 20% |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | Na afloop van de experimenten zullen de dieren onder verdoving gedood worden. De hersenen worden dan uit de dieren genomen om de locatie van de microdialyseprobe(s) te bevestigen. Soms worden ook andere organen en/of bloed verzameld om de concentratie van het geneesmiddel daar te bepalen. |

4 Drie V's

4.1 Vervanging

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije

De werkzaamheid van potentiële nieuwe geneesmiddelen moet in dieren worden aangetoond voordat deze in mensen mogen worden getest. Voor geneesmiddelen tegen hersenziekten is een van de eerste stappen daarbij om te bepalen of de stof na toediening aanwezig en/of werkzaam is in de hersenen. Hiervoor is een levend dier met een intacte circulatie en verbinding tussen lichaam en hersenen nodig.

alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

4.2 Vermindering

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Potentiële nieuwe geneesmiddelen worden eerst in vitro onderzocht, zodat alleen veelbelovende kandidaatstoffen in dieren getest worden. Deze onderzoeken leveren informatie op over o.a. dosering zodat er bij de dierproeven minder groepen getest hoeven worden.

Binnen dit project wordt het aantal benodigde dieren geminimaliseerd door kleine proefstudies uit te voeren en door de microdialysetechniek zelf. Deze maakt het mogelijk om binnen één dier meerdere metingen te verrichten waarvoor bij andere technieken veel meer dieren nodig zouden zijn.

4.3 Verfijning

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Muizen en ratten hebben een met mensen vergelijkbare fysiologie en bloed-hersenbarrière en er zijn verschillende ziektemodellen voor hersenziekten beschikbaar.

Per kandidaatstof, doelziekte, en vraagstelling wordt steeds bekeken welke van de diersoorten het meest verfijnd antwoord kan geven op de onderzoeksvraag. Zo zijn grotere dieren beter geschikt voor het plaatsen van meerdere probes, en is er soms al vooronderzoek gedaan of vervolgonderzoek gepland met een specifieke diersoort.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De operaties worden onder algehele verdoving en met passende pijnstilling uitgevoerd. Er is nazorg voor het herstellende dier. De dieren worden zoveel mogelijk zodanig gehuisvest dat ze elkaar kunnen horen, zien, en ruiken.

Er wordt gebruik gemaakt van een protocol voor herkenning en classificatie van ongerief, waar nodig wordt op passende wijze ingegrepen om verder ongerief te voorkomen. Vaardigheid in het uitvoeren van biotechnische handelingen en chirurgische ingrepen wordt uitgebreid getraind.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e namens Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Verzonden: dinsdag 15 december 2020 16:06
Aan: 5.1 lid2e; info@zbo-ccd.nl
CC: 5.1 lid2e; 5.1 lid2h
Onderwerp: RE: [External]: Aanhouden AVD 202011187

28

Geachte 5.1 lid2h

Bedankt het beantwoorden van de vragen, het document is in goede orde ontvangen.

Uw antwoorden worden in een schriftelijke ronde voorgelegd aan de CCD leden en ik heb goede hoop dat u voor de feestdagen een beschikking hebt over deze aanvraag.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: dinsdag 15 december 2020 14:43
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: [External]: Aanhouden AVD 202011187

26

Geachte 5.1 lid2e

Ik heb het antwoord op de vraag van de CCD in een word file via NetFTP ge-upload. Deze staat wel weer onder 5.1 lid2h

Ik heb voor de zekerheid het antwoord aan de mail toegevoegd.

Graag verneem ik van u wanneer wij een reactie kunnen verwachten gezien de naderende feestdagen?

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

Confidentiality Notice: The information contained in this email and any attachments are confidential and may contain privileged and/or proprietary information. This email is intended for the use of the addressee only. If you are not the intended recipient, you are strictly prohibited from copying, distributing or using this email or the information contained in it. If you received this email in error, please notify the sender immediately by email or telephone, and destroy any copies, electronic, paper or otherwise.



25

From: info@zbo-ccd.nl <info@zbo-ccd.nl>
Sent: Monday, December 14, 2020 9:07 AM
To: 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2e; .1 lid2h
Subject: [External]: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 02011187

Geachte 5.1 lid2e

Op 05-10-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202011187. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

Onduidelijkheden

Uw aanvraag is besproken in de vergadering van 11 december. In deze vergadering kwam de mogelijkheid van het gebruik van een physiologically based biokinetic model naar voren als mogelijke vervanging of verfijning. Kunt u aangeven of in de aanloopfase naar de dierproef toe dit model wordt toegepast om farmacokinetiek te meten? En zou dit model in ieder geval voor de wildtype dieren een vervanging kunnen zijn van de beoogde dierproeven?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Vraag PBBK

In deze vergadering kwam de mogelijkheid van het gebruik van een physiologically based biokinetic model naar voren als mogelijke vervanging of verfijning. Kunt u aangeven of in de aanloopfase naar de dierproef toe dit model wordt toegepast om farmacokinetiek te meten?

Physiologically based biokinetic modeling / physiologically based pharmacokinetic modeling (PBBK/PBPK) biedt een mechanistische benadering om de farmacokinetiek (PK) van geneesmiddelen te bestuderen en te voorspellen op basis van fysiologische en anatomische kenmerken, evenals de fysische en chemische eigenschappen van een bepaald geneesmiddel. Wij richten ons in onze PK-studies vooral op de penetratie van de bloed-hersenbarrière door de stoffen die wij testen. We zijn dan vooral geïnteresseerd in de aanwezige vrije concentratie van deze stof aangezien dit de werkzame fractie is. Alleen kandidaatstoffen die in *in vitro* testen veelbelovend zijn, worden ingezet in dierproeven. Echter, de fysische en chemische eigenschappen van deze nieuwe stoffen zijn nog niet voldoende bekend om te gebruiken als input voor realistische en betrouwbare modellen. Het is vooraf onbekend of en in welke mate de te testen stoffen de bloed-hersenbarrière penetreren. Bovendien is evaluatie van het model met informatie uit klinische data en/of de literatuur een essentiële stap bij PBBK-modeling. Omdat de kandidaatstoffen zich vroeg in het ontwikkelingstraject bevinden, ver vóór de eerste humane toediening, en aangezien het "nieuwe" stoffen betreft, zou deze evaluatie bij vrijwel alle kandidaatstoffen niet mogelijk zijn. Wij genereren met onze PK-studies data voor onze klanten die zij vervolgens eventueel kunnen gebruiken als input voor modeling systemen voor stoffen met een gelijke structuuropbouw/basisstructuur en tevens voor translationele doeleinden. Verder willen we naast de PK van een stof vaak ook de farmacodynamiek (PD) weten. Wij kunnen met behulp van de microdialysetechniek beide parameters bepalen in hetzelfde dier. Dit is ook (nog) niet mogelijk met PBBK-modellen. Om farmacokinetiek te "meten" van de stoffen die wij testen is voor ons PBBK modeling daarom vooralsnog geen alternatief.

En zou dit model in ieder geval voor de wildtype dieren een vervanging kunnen zijn van de beoogde dierproeven?

Zoals hierboven beschreven zou een initieel PBBK-model alleen gebaseerd kunnen zijn op *in vivo* data zoals wij die genereren. Daardoor zou het geplande PK- en/of PD-experiment toch moeten plaatsvinden, omdat deze gegevens vóór een eerste humane toediening beschikbaar moeten zijn. Hierdoor kan dit model ook voor de wildtype dieren geen vervanging zijn van de beoogde dierproeven.

Dus hoewel PBBK modeling zeker een interessante ontwikkeling is en (het vooral bij al bestaande/verder gevorderde {potentiële} geneesmiddelen) veel mogelijkheden biedt, kan het naar ons inzien helaas (nog) geen alternatief bieden voor de PK en PD metingen die wij voor early drug discovery verrichten. Omdat hiermee onze inschattingen over vervanging, dat: "Op dit moment bestaat er geen goed geïsoleerd systeem waarmee de hersenen in al hun complexiteit en samenspel met andere organen kunnen worden bestudeerd", namelijk "het geheel van lichaam en hersenen en de bloed-hersenbarrière." niet veranderen, hebben we ervoor gekozen om de tekst in de bijlagen over de 3V's niet aan te passen.

5.1 lid2e

Van: Blaauboer, B.J. (Bas)
Verzonden: zondag 20 december 2020 18:01
Aan: 5.1 lid2e
CC: Braunstahl, drs. F. (Ferry)
Onderwerp: RE: afhandeling aanvraag AVD202011187

31

Beste 5.1 lid2e

Het is inderdaad nodig om – als je een mail naar ons rvo-adres stuurt – me even te waarschuwen op het uur-adres. Wij kijken niet standaard iedere dag of langer op die rvo mail.

Voor wat betreft het antwoord: ik denk 5.2 lid1

Groet, goede kerst, en een gezond 2021!

Bas

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: dinsdag 15 december 2020 16:14
Aan: Blaauboer, B.J. (Bas)
Onderwerp: afhandeling aanvraag AVD202011187

29

Beste Bas,

Bij de bespreking van aanvraag AVD 5.1 lid2h 202011187 afgelopen vrijdag kwam naar voren dat 5.2 lid1
Het ging om de aanvraag
van 5.1 lid2h over microdialyse voor het testen van PK en PD in hersenaandoeningen.
5.1 lid5

De aanvrager heeft inmiddels geantwoord gegeven. Kan jij nog een extra controle geven of deze vragen voldoende helder beantwoord zijn?
Je mag me ook bellen op 5.1 lid2e

Groeten 5.1 lid2e

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: vrijdag 18 december 2020 11:28
Aan: 5.1 lid2h Blaauboer, B.J. (Bas)
CC: Info-zbo
Onderwerp: schriftelijke afhandeling AVD202011187
Bijlagen: Antwoord vraag CCD aanvraag AVD 5.1 lid2h 02011187 15_12_2020 (002).docx
Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

30

Beste Bas,

Ik had je dinsdag gemaïld over de schriftelijke afhandeling van AVD202011187. Aangezien ik nog geen antwoord het gehad probeer ik het ook nog even op je ¹¹⁹⁰⁸ email adres. Bij deze de boodschap:

Bij de bespreking van aanvraag AVD 5.1 lid2h 202011187 afgelopen vrijdag kwam naar voren dat 5.2 lid1
Het ging om de aanvraag van
5.1 lid2h over microdialyse voor het testen van PK en PD in hersenaandoeningen.
5.2 lid1

De aanvrager heeft inmiddels geantwoord gegeven. Kan jij nog een extra controle geven of deze vragen voldoende helder beantwoord zijn?

Je mag me ook bellen op 5.1 lid2e. Kan je het antwoord ook naar info@zbo-ccd.nl sturen? Ik ben volgende week vrij en deze aanvraag is inmiddels al over de termijn heen, dus dan kan hopelijk nog 5.1 lid2e de beschikking versturen.

Groeten 5.1 lid2h

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: maandag 28 december 2020 10:28
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: [External]: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202011187

33

Geachte 5.1 lid2e,

Dank voor de signalering. Wij zullen dit nakijken en zo spoedig mogelijk in orde maken.
Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

Confidentiality Notice: The information contained in this email and any attachments are confidential and may contain privileged and/or proprietary information. This email is intended for the use of the addressee only. If you are not the intended recipient, you are strictly prohibited from copying, distributing or using this email or the information contained in it. If you received this email in error, please notify the sender immediately by email or telephone, and destroy any copies, electronic, paper or otherwise.

From: info@zbo-ccd.nl
Sent: Monday, December 28, 2020 10:16 AM
To: 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2e
Subject: [External]: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202011187

32

Geachte 5.1 lid2e

Op 05-10-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202011187.

De CCD heeft een besluit genomen over uw aanvraag.

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de leges hebben ontvangen.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2h

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD **5.1 lid2h** 202011187
Bijlagen
3

Datum 29 december 2020
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte **5.1 lid2e**,

Op 5 oktober 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel." met aanvraagnummer AVD **5.1 lid2h** 202011187. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 januari 2021 tot en met 31 december 2025.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2026 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Datum:

29 december 2020

Aanvraagnummer:

AVD **5.1 lid2h** 202011187

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie **5.1 lid2h** (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 17 november 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 4 december 2020 en 14 december 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het bespreken van alternatieven, verduidelijking van de humane eindpunten, berekening van het aantal dieren en taalgebruik in de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat u in uw aanvraagformulier een periode van 6 jaar had ingevuld. De CCD mag een project voor maximaal 5 jaar vergunnen.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2026 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen

bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Datum:

29 december 2020

Aanvraagnummer:

AV 5.1 lid2h 202011187

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

5.1 lid2h

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: 5.1 lid2h
Adres: 5.1 lid2h
Postcode en plaats: 5.1 lid2h
Deelnemersnummer: 5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2021 tot en met 31 december 2025, voor het project "Farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202011187, na advies van dierexperimentencommissie 5.1 lid2h. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 5.1 lid2e. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 5 oktober 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 9 december 2020;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren, zoals ontvangen op 9 december 2020;
 - 3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen, zoals ontvangen op 9 december 2020;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 9 december 2020;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 17 november 2020
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 8 december 2020, 15 december 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in gezonde dieren			
	Muizen (Mus musculus)	1.200	100,0% Matig
	Ratten (Rattus norvegicus)	1.800	100,0% Matig
3.4.4.2. Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen			
	Muizen (Mus musculus) / ziektemodellen van neurologische aandoeningen	300	20,0% Ernstig 80,0% Matig
	Ratten (Rattus norvegicus) / ziektemodellen van neurologische aandoeningen	450	20,0% Ernstig 80,0% Matig

Aanvraagnummer: AVD 5.1 lid 2n 02011187

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2026 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AV **5.1 1182H** 202011187

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:
AVD 5.1.1d2n 202011187

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Ontwikkeling van geneesmiddelen tegen hersenziekten met behulp van microdialyse
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Microdialyse, Farmacokinetiek, Farmacodynamiek, Translationeel geneesmiddelenonderzoek, Centraal zenuwstelsel

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Ziekten van het centraal zenuwstelsel, zoals multiple sclerose of de ziekte van Parkinson of Alzheimer, hebben een grote impact op de maatschappij. Ontwikkeling en markttoelating van nieuwe geneesmiddelen is dus nodig. Het doel van dit project is om in levende dieren met behulp van microdialyse (en vaak additionele afname van ruggemergvocht- en/of bloedmonsters) de verdeling en de werkzaamheid te bepalen van potentiële nieuwe geneesmiddelen die gericht zijn tegen hersenziekten. Microdialyse werkt met een katheter in de hersenen, die voorzien is van een heel fijn filter om stoffen uit de hersenen op te kunnen nemen zonder vloeistof uit de hersenen te halen.
---	--

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Dit project zal bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen tegen hersenziekten. De microdialysetechniek is geschikt om zowel de concentratie van een toegediende stof als de concentratie van lichaamseigen signaalstoffen betrokken bij de ziekteprocessen te meten. Deze informatie is van belang als eerste stap in de uiteindelijke toelating van nieuwe geneesmiddelen op de markt. Door dit onderzoek kan het daaropvolgende en voor registratie wettelijk vereist onderzoek doelgerichter en met minder dieren worden uitgevoerd.
3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Maximaal 3750 dieren (1500 muizen en 2250 ratten). Maximaal 750 daarvan (300 muizen en 450 ratten) zijn dieren die symptomen van bepaalde hersenziekten kunnen vertonen (ziektomodellen).
3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	<p>De dieren ondergaan een operatie voor het inbrengen van één of meerdere katheters voor de monsterafname. Na het herstel zijn er geen negatieve gevolgen voor het welzijn van het dier door de aanwezigheid van de implantaten. Wel moeten de dieren, om de implantaten zoveel mogelijk intact te houden, na de operatie individueel gehuisvest worden.</p> <p>Na toediening kunnen er bijwerkingen van de te testen kandidaatstoffen optreden. Deze kunnen ongerief voor de knaagdieren veroorzaken.</p> <p>Tijdens de microdialyse worden soms ook bloed- of ruggemergvochtmonsters afgenomen. Bij (herhaaldelijke) afname door een geïmplanteerde katheter hebben de dieren hier weinig last van, bij bloedafname zonder katheter kan licht ongerief optreden.</p> <p>Bij een klein deel van de experimenten zal gebruik worden gemaakt van diermodellen voor de hersenziekten waartegen de kandidaatstoffen getest worden (maximaal 20% van de dieren). Deze dieren kunnen last hebben van symptomen die lijken op die van patiënten met de hersenziekte. Daarom wordt voor elk ziektemodel apart een inschatting van het ongerief gemaakt.</p>
3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	<p>De totale belasting per dier wordt als volgt ingeschat:</p> <ul style="list-style-type: none"> - voor de wildtype/gezonde dieren: matig ongerief 100% - voor de ziektemodellen (maximaal 750 dieren): matig ongerief 80%, ernstig ongerief 20%
3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Na afloop van de experimenten zullen de dieren onder verdoving gedood worden. De hersenen worden dan uit de dieren genomen om de locatie van de microdialyseprobe(s) te bevestigen. Soms worden ook andere organen en/of bloed verzameld om de concentratie van het geneesmiddel daar te bepalen.

4 Drie V's

4.1 Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije	De werkzaamheid van potentiële nieuwe geneesmiddelen moet in dieren worden aangetoond voordat deze in mensen mogen worden getest. Voor geneesmiddelen tegen hersenziekten is een van de eerste stappen daarbij om te bepalen of de stof na toediening aanwezig en/of werkzaam is in de hersenen. Hiervoor is een levend dier met een intacte circulatie en verbinding tussen lichaam en hersenen nodig.
---	---

alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Potentiële nieuwe geneesmiddelen worden eerst in vitro onderzocht, zodat alleen veelbelovende kandidaatstoffen in dieren getest worden. Deze onderzoeken leveren informatie op over o.a. dosering zodat er bij de dierproeven minder groepen getest hoeven worden.

Binnen dit project wordt het aantal benodigde dieren geminimaliseerd door kleine proefstudies uit te voeren en door de microdialysetechniek zelf. Deze maakt het mogelijk om binnen één dier meerdere metingen te verrichten waarvoor bij andere technieken veel meer dieren nodig zouden zijn.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Muizen en ratten hebben een met mensen vergelijkbare fysiologie en bloed-hersenbarrière en er zijn verschillende ziektemodellen voor hersenziekten beschikbaar.

Per kandidaatstof, doelziekte, en vraagstelling wordt steeds bekeken welke van de diersoorten het meest verfijnd antwoord kan geven op de onderzoeksvraag. Zo zijn grotere dieren beter geschikt voor het plaatsen van meerdere probes, en is er soms al vooronderzoek gedaan of vervolgonderzoek gepland met een specifieke diersoort.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De operaties worden onder algehele verdoving en met passende pijnstilling uitgevoerd. Er is nazorg voor het herstellende dier. De dieren worden zoveel mogelijk zodanig gehuisvest dat ze elkaar kunnen horen, zien, en ruiken.

Er wordt gebruik gemaakt van een protocol voor herkenning en classificatie van ongerief, waar nodig wordt op passende wijze ingegrepen om verder ongerief te voorkomen. Vaardigheid in het uitvoeren van biotechnische handelingen en chirurgische ingrepen wordt uitgebreid getraind.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

5.1 lid2e

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: woensdag 6 januari 2021 15:59
Aan: 5.1 lid2h |
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 02011187

36

Geachte 5.1 lid2h

Op 05-10-2020 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel.' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202011187.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op het bespreken van alternatieven, verduidelijking van de humane eindpunten, berekening van het aantal dieren en taalgebruik in de NTS.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 29-12-2020.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d en artikel 10a1 lid 3 van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan.

Bij de beantwoording van de beoordelvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing en de ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen. Bij enkele vragen is het echter niet geheel duidelijk hoe u tot uw conclusie bent gekomen, te weten: - Bij C10 (huisvesting) benoemt u het gebruik van metabole kooien om urine en feces op te vangen. Wij hebben dit echter niet terug kunnen lezen in de aanvraag. Wellicht dat dit wel in een eerdere versie stond en het DEC-advies niet is aangepast? - Bij C11 (ongerief) benoemt u niet dat 20% van de proefdieren van bijlage 2 ernstig ongerief ondergaan. In verband met dit ernstige ongerief is een beoordeling achteraf noodzakelijk. - Bij C13 (HEP's) benoemt u dat verwacht wordt dat 0-5% van de dieren een HEP zullen bereiken. In DAP 2 is dat echter ingeschat als 5-10%. Tevens oordeelt u dat de HEP's goed beschreven zijn. Wij willen u er echter op attent maken dat in bijlage 3.4.4.2 wordt verwezen naar interne SOP's van de aanvrager. De HEP's dienen echter in de bijlage zelf te worden benoemd. Aangezien wij geen inzicht hebben in deze SOP's hebben wij de aanvrager verzocht om deze alsnog toe te voegen, zodat wij kunnen beoordelen of de HEP's adequaat zijn. - Bij C18 (geslachten) Beschrijft u dat de 5.1 lid2h in sommige gevallen zich zal willen beperken tot het gebruik van 2 geslachten. Wij hadden graag in uw advies teruggelaten of u de onderbouwing hiervoor voldoende vindt. - Bij C19 (doding) beschrijft u: Wanneer geen stofconcentraties in weefsels bepaald moeten worden, zullen honden niet gedood worden maar kunnen worden hergebruikt. Omdat er voor dit project geen honden worden gebruikt zijn wij ervan uit gegaan dat het hier gaat om een kennelijke verschrijving. Indien dit niet het geval is vernemen wij dat graag.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl