



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

<p>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></p>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 5.1 lid2h <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
<p>1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.</p>	<p>Naam instelling of organisatie 5.1 lid2h</p> <p>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde 5.1 lid2e</p> <p>KvK-nummer 5.1 lid2h 5.1 lid2h</p>
<p>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></p>	<p>Straat en huisnummer 5.1 lid2h 5.1 lid2h</p> <p>Postbus 5.1 lid2h</p> <p>Postcode en plaats 5.1 lid2h</p> <p>IBAN 5.1 lid2h</p> <p>Tenaamstelling van het rekeningnummer</p>
<p>1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<p>(Titel) Naam en voorletters 5.1 lid2e <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</p> <p>Functie 5.1 lid2e</p> <p>Afdeling 5.1 lid2h</p> <p>Telefoonnummer</p> <p>E-mailadres 5.1 lid2e</p>
<p>1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<p>(Titel) Naam en voorletters <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</p> <p>Functie</p> <p>Afdeling</p> <p>Telefoonnummer</p> <p>E-mailadres</p>

- 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
- AVD **5.1 lid2h** 20173904
- 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 - 10 - 2019 |
| Einddatum | 31 - 12 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Pharmacokinetic screening of pharmaceuticals.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Farmacokinetische screening van potentiële geneesmiddelen.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------------|
| Naam DEC | 5.1 lid2h |
| Postadres | |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege
 Wijziging € 859,- Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur
- 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.*

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	24 - 7 - 2019
Handtekening	



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 Provide the title of the project.

Pharmacokinetic screening of pharmaceuticals.

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Introduction:

The development of new medicines for treatment of human diseases, either chemical entities or biological entities (further to be referred as Test Substances) requires a long research period of many years. The development process is divided into different steps and includes computational chemistry, compound binding studies, functional biological screens, in vitro assays and ex-vivo assays using cell or tissue cultures. The final research phase before entering preclinical development will include efficacy of the new Test Substance in a suitable disease model and assessment of the first indication for adverse effects. However, in early development and without using in-vivo research, the bioavailability of such test substances is nearly impossible to determine. It is therefore important to determine the Pharmacokinetics (PK) of the Test Substance in relation to the proposed treatment route and mode of action in-vivo. In this early stage, the developing company has developed a (small) portfolio of Test Substance candidates sometimes with small structural variations of the Test Substance. These might be small differences in chemical structure or small changes causing differences in affinity in the case of antibodies.

It is then that the first in-vivo screening studies are warranted to make a selection of the Test Substance with the most promising PK profile for further research like efficacy and early toxicology assessments. In these PK studies, the bioavailability, preferred route of administration, half-life of the Test-Substance and first indications of tolerability and/or adverse effects are investigated. For this research, the participation of specialized and experienced companies, so called 5.1 lid2h, is often asked. The information derived from these experiments are used to select the preferred candidate, administration route and dose precluding unsuitable candidates from further development. This in turn will reduce the number of animals to be used in future preclinical studies.

The in vivo studies requested in this project application are limited to Drug Metabolism Pharmacokinetic (DMPK) studies. This project proposal describes the first in-vivo screenings with limited numbers of animals (2 - 24 animals per group) for customers aiming to establish the first in-vivo profile.

Background:

5.1 lid2h is a Dutch subsidiary of 5.1 lid2h. As an 5.1 lid2h, specializes in safety research for new and existing drugs, chemical substances and agrochemical products. Clients are pharmaceutical, chemical and agro-chemical companies worldwide. 5.1 lid2h is both GLP (Good Laboratory Practice) and AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) certified.

5.1 lid2h scientists have a broad experience in different aspects of the pharmaceutical and chemical development processes and are therefore able to provide clients with expert advice on the studies required including the design and execution of such studies, and the interpretation of the results. They are also able to provide expert advice at key decision points of drug discovery and development, and of chemical registration processes.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focused on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The objective of this project is to (de-)select preclinical candidates based on their PK profile in rat, mouse or guinea pig and/or dog. This will enable and support drug design programs for the development of test substances (pharmacological and biological entities) to be used for treatment of human diseases. The program of work defined under this project proposal will take place early in the discovery stage (i.e. pre-clinical candidate selection and improvement).

The aim of these first in-vivo studies is to establish bio-availability of test substances via determination of pharmacokinetic parameters (C_{max} and AUC in plasma/blood and/or tissues and/or excreta) and based on this (de-)select compounds for further development and/or to select the most optimal route, dose level or formulation.

The technical execution of the studies are described in Standard Operating Procedures.

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

The principal benefit of the project is the provision of data to facilitate decisions on selecting the optimal test substance, route and dose of test substances to which humans will eventually be exposed as part of a treatment for a specific disease. The information derived from these studies will also be used to preclude unsuitable candidates from further development. For these purposes, the use of animals to develop future effective and safe treatments of human diseases is considered socially relevant. In addition, performing

screening studies will reduce the use of animals in the later-stage development process.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

General strategy to design the study plan

For each individual PK study, the design and experimental work is documented in a study plan. This is authorized by the Study Director (SD) with respect to the scientific objectives, project compliance and the 3Rs before scientific procedures commence, and is reviewed by the Animal Welfare Body (AWB). All known test substance characteristics and available background information will be taken into account in the design of the study (see 3.4.2) including dose level setting. Dose levels are chosen based on the intended therapeutic dose and pharmacodynamics information available, to preclude any toxicity from occurring. Based on the available information the most appropriate study design will be determined. Studies are designed to obtain a maximum amount of data from the smallest number of animals. In general, the number of animals used for each study is considered to be the minimum needed to meet the aim of the study.

The selection of the animal species will be in principle rodents (rats, mice or guinea pigs only) and or dogs determined (inter alia) by:

- Intended use of the substance;
- Potential pharmacodynamic characteristics of the substance;
- In vitro metabolism data of the substance;
- Potential side effects.

The PK studies tend to be tested in the pharmacodynamics species of choice, so dose predictions for efficacy can be made. Efficacy animal models are usually rat, mice or guinea pig models, depending on the specific target receptor or enzyme of interest. Thus the use of a specific efficacy model will be a driver for the choice of rodent. Secondly, cell biology or biochemical assays with human and rodent cell lines will give an indication which rodent cell/protein behaves like the human. In some cases there is more sequence homology of the human receptor/enzymes to one species over the other. Dogs can be chosen in case there is a disconnect between in-vitro metabolism between human and rodents, or where there is specific intended use (e.g. compounds that are specifically developed to increase the oral bioavailability over the GI tract), or potential side effects (e.g. cardiovascular).

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

Prior to the start of the in vivo study the following items will be evaluated:

- 1) **Substance identity:** a unique identifier (e.g. 5.1 lid2h structural formula) for the chemical or biological identity of the test substance is determined at this stage.
- 2) **Intended use of the substance and stage of drug development phase:** use in humans for treatment of diseases and studies needed in discovery/screening phase.
- 3) **Most relevant route of exposure:** is generally also used in animal testing. If justified, another less relevant route of exposure may be chosen, e.g. based on technical feasibility / practicality of the testing. In such case, it will be ensured that the study remains valid for its intended use. Sometimes multiple routes of exposure are relevant.
- 4) **Availability of other information:** additional information like physico-, chemical and/or biological information may be collected, like IC50 data from cell assays. This may be used to help drafting an optimal study design and may preclude duplication of studies.
- 5) **Laboratory animal species/strain:** In principle rodents (rats, mice or guinea pigs) are to be selected. Only in case of specific study requirements the use of dogs is warranted (e.g. compound metabolism, physiology of organs, potential side effects).

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

Process and content of a study

In general, each in-vivo study consist of different phases (details per type of study are included in the Appendices):

- Acclimation phase: animals will be habituated to their environment, diet etc., which promotes both animal welfare and reproducible experimental results.
- Test phase: Test substances and, if needed, positive and/or negative (vehicle) control substances are administered by scientifically relevant routes, followed by clinical

observations, and collection of blood and optional other body fluids, excreta and/or organs/tissues for subsequent analysis.

- Recovery phase: In case of dogs, a recovery phase of at least two weeks will be used in between different studies. Dogs will only be re-used in case the discomfort has not exceeded moderate.

Usually a single dose will be administered using varying routes and/or doses. Only in specific cases (where compound accumulation is a potential concern), repeated dosing for maximally one week may be necessary to reach maximal plasma levels. The route and frequency of administration will be detailed in the study plan. Treatment in fasted or fed animals is possible, depending on substance characteristics. Guinea pigs are more sensitive for diet restrictions and will not be fasted. All treatment specifications and justifications will be documented in the study plan and is subject to review of the Animal Welfare Body according to Wod art 10.1.3.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Pharmacokinetic screening in rodents
2	Pharmacokinetic screening in dogs

This project consists of 2 appendices as summarized below. A more detailed description is given in Appendices 1 and 2. In most cases rodents are the preferred species for first PK studies, but depending on the intended use of the compound, pharmacodynamics characteristics or metabolism of the compound, dogs might be needed instead of rodents. Occasionally, PK studies in rodents might be followed by PK studies in dogs for a selection of test substances.

- Appendix 1: Pharmacokinetic screening in rodents
- Appendix 2: Pharmacokinetic screening in dogs

Appendix 1 –Pharmacokinetic testing in rodents: Basic kinetic parameters determined in these studies will provide information on the availability of the Test Substance in blood / organs, half-life and potential for accumulation of the test substance in tissues and/or organs and the potential of biotransformation following exposure to the test substance. Kinetics will help to determine the optimal route and dose for further evaluation of the test substance and potential (unwanted) side effects. This will help the client in selecting the most promising candidate (whether or not a candidate should be developed further), selection of formulations, treatment regimens, dose levels and/or routes of administration.

Appendix 2 – Pharmacokinetic testing in dogs: Similar type and goal of studies as Appendix 1. Studies will be executed in dogs; depending on the intended use of the compound, pharmacodynamics characteristics, metabolism of the compound, or potential side effects, dogs can be the appropriate species to screen compounds for PK characteristics. This rationale for the use of dogs needs to be well-defined and documented.



Centrale Commissie Dierproeven

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Pharmacokinetic screening in rodents

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The in vivo studies requested in this project application are limited to Drug Metabolism Pharmacokinetic (DMPK) studies. (DM)PK studies are conducted to obtain the first in vivo information on bioavailability of test substances. This information is used to support candidate selection (whether or not a candidate test substance should be developed further). Furthermore, kinetics may help to predict the dose for future efficacy and possible toxicology studies by demonstrating that the test animals are systemically exposed to the test substance, and by determining half-life, optimal route and circulating entities (parent substance/metabolites). Basic kinetic parameters determined in these studies will also provide information on the potential for accumulation of the test substance in tissues and/or organs and the potential of biotransformation following exposure to the test substance.

In addition, pharmacokinetic studies will provide data to facilitate:

- selection of formulations;
- selection of treatment regimens;
- selection of dose levels or routes of administration.

Primary outcome parameters: concentration of test substance in blood (or other excreta) by C_{max}, AUC, t_{1/2} values.

In order to study the kinetics of a test substance, it is administered to animals by a relevant route,

followed by observation of the animals and blood sampling at specific time points. Optionally sampling of excreta and/or organs/tissues at specific time points, and possible collection of other body fluids for subsequent analysis can be conducted. The study design depends upon which kinetic parameter needs to be studied (Absorption, Distribution, Metabolism and/or Excretion). If absorption or excretion are the primary parameters, blood and plasma C_{max} and AUC data will be sufficient; if distribution or organ penetration needs to be studied, tissue sampling is necessary; if metabolism is of concern, then excreta might be collected as well. The specifications will be motivated and defined in the study plan and discussed with the AWB.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

During the study the following animal procedures may be conducted:

- *Acclimation phase*: animals will be habituated to their environment, diet etc., which promotes both animal welfare and reproducibility of experimental results. The acclimation phase will be at least 5 days.
- *Administration*: to achieve the study objectives animals will be dosed with the test substance or receive vehicle¹ or positive control substances (e.g. already marketed drugs). **In rats and mice**, substances can be administered by several routes, including but not limited to: oral (gavage, capsule, dietary) / by injection (intramuscular, intravenous, intra-arterial, perivenous, subcutaneous, intraperitoneal, intradermal) or alternatively by inhalation (nose only) / dermal (topical) / intra- intestinal via implanted cannula / buccal (oromucosal) / ocular / intranasal / intratracheal / rectal / vaginal / (amongst others), and by infusion (intravenous, intra-arterial).
- **In guinea pigs**, substances can be administered by several routes, including but not limited to: oral (gavage, dietary) / by injection (intramuscular, intravenous, subcutaneous, intraperitoneal, intradermal) / dermal (topical) / ocular / intranasal / intratracheal / rectal / vaginal / (amongst others).

¹*Vehicle administration*: in rare occasions, a vehicle needs to be used which has not been used before in this facility. This can be the case with test compounds that have low water solubility that need to be administered intravenously in order to determine its absolute bioavailability. In those occasions, in first instance literature information will be obtained but if this gives insufficient information the vehicle will be administered in maximally 2 animals prior to any test substance dosing; the animals will be observed frequently after administration, up to 24 hours after administration. In case of adverse effects, humane endpoints (ENV/JM/MOMO/2000/7) will be applied when appropriate. Vehicle administration may also be warranted if endogenous levels of the test compound are present.

The most relevant route of exposure in humans is in most cases also the route of administration in the animal study. But for first application, comparison with the i.v. route or other administration routes relevant for human use (for instance, to compare with the intended parenteral human route of exposure) can be used in order to determine absolute bioavailability/absorption. Unless otherwise specified, the administration of substances and the sampling procedures will be conducted such that the discomfort will be no more than transient mild and that no lasting harm occurs.

Frequency of administration will be a single dose in most cases; optionally a repeated dose might be necessary in case accumulation of the test compound is of concern.

For a repeated dose study, the most commonly used frequency is once daily. The frequency is based upon available literature, in silico and/or in-vitro data, expected dosing regime in humans, experience, animal welfare considerations and advice of the AWB.

The duration of treatment for this application will be maximally one week with a maximum of 14 applications (twice daily for one week).

Clinical observation: clinical signs will be assessed twice daily for the first application followed by at least once daily to assess the health condition of the animal. Frequency of observations may be increased in case severity is increasing from mild to moderate.

Blood sampling in rats and mice: blood may be sampled on one or more occasions (under anesthesia if applicable) using peripheral / superficial vessels, major blood vessels / an implanted cannula / cardiac puncture (procedure under terminal anesthesia). **Blood sampling in guinea pigs**:

blood may be sampled on one or more occasions (under anesthesia if applicable) using peripheral / superficial vessels, major blood vessels / an implanted cannula / cardiac puncture (procedure under terminal anesthesia). More specific, blood can be collected preferably from the saphenous, tarsal, or jugular vein. The purpose of blood collection is to derive concentration of test substance in blood for kinetic parameters. The amount of blood collected will remain within the internationally accepted limits (Diehl et al., J. Appl. Toxicol., 2001, 21, 15-23), according to animal ethical standard procedures.

Body fluids or excreta sampling: may be performed optionally as follows: excreta (faeces) and/or urine using metabolism cages for max 1 day (24h).

Confinement and restraint: one or more of the following methods may be used: manual restraint for oral dosing, short term separation (e.g., for observation purposes), 24 h metabolism cages, single housing in case of male mice fighting or with scientific justification like dermal application or permanently implanted catheters.

Food and/or water deprivation: may be withheld, and will be clearly documented in the study plan. Treatment under fasted or fed conditions might be preferred depending on compound characteristics. The duration of fasting will be according to best practice procedures with maximum withholding period for water of 8 hours and 24 hours for food in case of rats. In case of mice there will be no withholding of water and a maximum of 6 hours withholding of food, where applicable.

Guinea pigs are more sensitive for diet restrictions and will not be fasted.

Removal of hair: may be performed by chemical or mechanical procedures, in order to facilitate test substance administration (e.g. dermal dosing), to facilitate local observations and better exposure to light/air, as preparation for surgery and to improve recovery of the underlying surface.

Temperature: body temperature (e.g. rectal) may be measured using suitable devices.

Surgical preparation: rats may undergo surgical cannulation of blood vessels and or ducts with or without exteriorization. An adequate recovery time will be implemented.

All the above-mentioned procedures are described in Standard Operation Procedures (SOPs) which contain best practice procedures and are, *inter alia*, reviewed by Animal Welfare Body and Study Director.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Screening studies are used to preclude unsuitable candidates from further development based on pharmacokinetic characteristics like bioavailability and/or to select the most optimal route, dose level or formulation. Since screening studies are used as a selection tool whereby compounds (or routes, doses, formulations) are ranked compared to one another, the determination of definite pharmacokinetics is less important. Therefore, the number of animals can be kept as low as possible (see Section B, Table 1), and 2-4 animals per group will be sufficient to give information for ranking of compounds (or routes, doses, formulations). In case of mice, more animals are needed as only a limited amount of blood can be collected from these small animals. **In case of guinea pigs more animals may be included as only a limited number of blood collections can be performed per animal.** Depending on the detection limit/sensitivity of the required biomarkers/measurements more animals may be required for a proper scientific evaluation, up to the maximum mentioned in Table 1.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Species and origin:

Rodents: **Mice, rats and guinea pigs**, obtained from certified international breeders/suppliers and transported by a certified and approved animal courier. Surgery models may be used and might be done internal or external (e.g. with implanted jugular vein catheter). The preferred species will be the rat, since it is possible to obtain multiple blood samples from one animal.

In some cases, it might be necessary to generate pharmacokinetic data in genetically-modified animals, e.g. if future efficacy, toxicity or pharmacology studies will be performed in genetically-modified animals and supporting pharmacokinetic data are necessary for data interpretation. Genetically altered rodent strains used under this protocol are not expected to exhibit any harmful phenotype.

The preferred species is the rat but selection of mice or **guinea pig** might be necessary for the study depending on the following:

- Intended use of the substance;
- Potential pharmacodynamic characteristics of the substance;
- In vitro metabolism data of the substance;

- In addition, the guinea pig will be specifically used in screening studies to identify compounds that have

the right PK profile for subsequently use in a guinea pig cough model (performed externally) reflecting the human situation. This cough model cannot be performed in rats or mice.

The PK studies tend to be tested in the pharmacodynamics species of choice, so dose predictions for efficacy can be made. Efficacy animal models are usually rat or mice models, depending on the specific target receptor or enzyme of interest. Thus the use of a specific efficacy model will be a driver for the choice of rodent. Secondly, cell biology or biochemical assays with human and rodent cell lines will give an indication which rodent cell/protein behaves like the human. In some cases there is more sequence homology of the human receptor/enzymes to one species over the other. This species will then be chosen for the PK screening as well. Differences in in-vitro metabolism between human, rat and mice can be a driver for choice of rodent as well.

Age and sex:

In general the age of the animals should be representative for the human situation. Usually, young adult animals used, but if necessary the age of the animals may be adapted to the required study design.

Usually one sex is used for screening PK studies, since they are used as a screening tool and not for providing definitive pharmacokinetic characterizations. Unless test substance characteristics warrant the need for a specific sex, there is no sex preference for this type of study and either sex can be used.

Number of animals:

In a screening study, usually compounds of the same chemical class or for the same therapeutic indication will be tested. The total number of groups, and therefore total number of animals, per study depends on the number of compounds, routes, dose levels or formulations tested in one study plan (each compound, or dose, or route or formulation tested will be 1 group). The total number of animals per screening study (plan) is limited to the maximum number of animals mentioned in Table 1.

Table 1: maximum number of rodents per screening study:

Screening in rodents per study:	Number of animals/ group		
	N per group:	Max. no animals per screening study	Estimated total number of animals per 5 years
rats	2-4 animals/group ¹ .	60	3000
mice	2-24 animals/group ^{1,2}	200	1000
guinea pigs	2-6 animals/group ^{1,3}	24	800

Note:

- 1) The number of animals in a group for screenings studies is smaller than for standard guideline studies, e.g. in a default 28-day duration regular toxicology study the number of animals per group is 5-10 main animals/sex/group = 10-20 animals/group.
- 2) In case of mice more animals will be included as only a limited amount of blood can be collected from these small animals. Sample volumes will be kept as small as possible (depending on the compound and the sensitivity of available bioanalytical method) to keep the number of additional animals as low as possible. When higher sample volumes are required, the number of animals needs to be increased accordingly up to the maximum number mentioned in the table.
- 3) In case of guinea pigs more animals may be included as only a limited number of blood collections can be performed per animal.

In case of unexpected adverse effects, additional animals may be required, either as addition or replacement using a lower dose of test substance or an alternative vehicle. This will be verified by the Animal Welfare Body and may imply an amendment to the project. In case of death of an animal(s), which is not related to the test substance or treatment procedures, this animal(s) may be replaced by a spare animal.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number

5.1 lid2h is actively involved within the Dutch Three R center, and regularly interacts with global regulatory agencies and the European Lab Animal Science (FELASA) network, the company is well positioned to encourage adoption and improvement of animal welfare best practice within regulatory testing and 5.1 lid2h

In the light of the NCad guideline 'Transitie naar proefdiervrij onderzoek', study designs are reviewed at regular intervals (in conjunction with changing guidelines or recommendations) as well as on an ad-hoc basis (in conjunction with the client) to incorporate available refinements, to minimise animal numbers or to reduce severity of discomfort. The company is actively involved in cross-industry initiatives, aimed at sharing best practice and application of the 3Rs.

Replacement

Before starting the first in-vivo screenings, a lot of data are already available from by in silico studies and in vitro experiments. A typical screening cascade within Drug Discovery will include design and synthesis by computer-aided drug discovery (CADD) and calculation of physicochemical properties (clogP, logD, MW), functional biological screens (e.g receptor binding, efficacy and selectivity screens) and in-vitro DMPK assays (permeability, microsomal metabolism, solubility).

However, so far, no alternatives are available for the described DMPK studies. For meaningful and reliable evaluation of compound kinetics, the target physiological systems must be intact, with complete neural and humoral controls modulating any responses. In vitro and ex-vivo test systems in isolation are inadequate for comprehensive determination of kinetics.

Reduction

The minimal number of animals used in a screening study is based upon common practice for blood sampling. Studies are designed to obtain maximum data from the smallest number of animals. In general, the number of animals used in each study is considered to be the minimum needed to rank-order compounds based on pharmacokinetic parameters. As mentioned above, study designs are further refined, to identify the optimum animal number to achieve study objectives. Based upon the conducted screening studies described in this appendix, future efficacy, pharmacological and toxicological studies can be designed with the lowest number of animals and with (in principle) no adverse effects with the selected test-substances in the optimal dose.

Refinement

Animal welfare is of utmost importance and Good Surgical Practice will be observed for any animal undergoing surgical procedures. In addition, care is taken to provide as much environmental enrichment as possible (e.g. play items and shelters for rodents) and the company has working parties that regularly test and evaluate environmental enrichment items or practices.

Measures are in place to minimise animal suffering, the results of each study influencing the design and dose-selection in subsequent related studies. This allows progressive characterization of adverse effects so that unnecessary testing or use of inappropriate dosages can be avoided.

The involvement of experienced and qualified (art. 13f2a and b) animal care staff occurs at an early stage, so that advice can be given on implementation of the 3Rs and any appropriate refinements are being implemented.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The majority of animals are not expected to show signs of (severe) effects that have impact on their general well-being. In the event of an animal showing unexpected signs of an adverse reaction, immediate veterinary advice will be sought (e.g. modification of study design/ withdrawal from treatment, abrogation of the study) or humane end-points (ENV/JM/MOMO/ 2000/7) applied where appropriate.

Studies involving potential therapeutic agents (pharmaceuticals) may produce pharmacological or pharmacodynamic effects with certain discomfort (max moderate), but these would not be expected to persist for longer than 24 hours. Unless otherwise specified, the administration of substances and

the sampling procedures will be undertaken using a combination of volumes, routes and frequencies that of themselves will result in no or at most transient mild or moderate discomfort and no lasting harm.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Repetition of studies will be avoided as much as possible. The study history of the test substance will be queried (to complete the 6 item checklist mentioned in the Project Proposal) from the sponsor to guarantee optimal study design.

Repetition of a certain study could occur on incidental basis, for example when a previous study failed because of a test substance contamination issue.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Male mice, surgically-instrumented animals and animals with dermal/topical applications will be single-housed in order to prevent fighting and/or damage to the instrumentation or dermal application. Animals will have visual, auditory and olfactorial contact where possible. In addition, for collection of excreta animals will be single-housed in metabolism cages for a maximum of 24h. Other housing and care conditions will be in accordance with Directive 2010/63/EU.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Anesthesia will be used during surgery, prior to euthanizing animals and/or during blood collection (if applicable for the procedure). Analgesia might be used prior to and after surgery, this will depend on the type of surgery.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Adverse effects caused by the test substance might be observed. In addition, some adverse effects caused by the method of dosing, sampling of body fluids, single housing/metabolism cage, surgical instrumentation and restraining could occur.

Explain why these effects may emerge.

For test substances that are at an early stage of development, there will be little or no animal data available. Hence, occasionally unexpected adverse effects might occur.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

A careful approach will be adopted to minimize the severity of any discomfort. Animals are being monitored, and humane end-points (ENV/JM/MOMO/ 2000/7) will be applied where appropriate. In response to developing unexpected discomfort, involvement of the Animal Welfare Body and veterinarian will be sought at the earliest possible stage when potential issues of concern arise or when unusual events (within the context of the study) first occur.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Animals showing pain, distress or discomfort which is considered not transient in nature or is likely to become more severe, will be killed for humane reasons, based on OECD guidance document on humane endpoints (ENV/JM/MONO/ 2000/7).

Indicate the likely incidence.

The incidence is estimated as minimal and is expected < 1%

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The expected cumulative discomfort for these studies will be mild or moderate. For the large majority of studies it is not expected that the severity will increase by test substance related effects. In very rare cases the discomfort might increase by test substance related effects.

Table 3: Percentage of animals & expected levels of discomfort

Species used in DM(PK) studies:	% mild	% moderate
Rats, mice and guinea pigs	80	20

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Animals will be killed at the end of the treatment period for of collection of organs/tissues,.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



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
- 1.2 Looptijd van het project
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5)

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- 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 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- De wijziging van het project "Farmacokinetische screening van potentiële geneesmiddelen" heeft betrekking op het gebruik van cavia's in screening studies. Het doel van het project blijft hetzelfde.
- Het proefdier (cavia) krijgt één of meerdere doseringen van het kandidaat middel waarna op verschillende tijdstippen bloed wordt afgenomen (conform Good Practice). In het laboratorium wordt vervolgens bepaald hoeveel van het middel in het bloed terug is te vinden. Dit wordt farmacokinetisch (PK) onderzoek genoemd. Tevens kunnen er ook organen worden verzameld voor PK.

- | | |
|---|---|
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Dit project draagt bij aan de ontwikkeling van nieuwe humane geneesmiddelen. De cavia wordt specifiek gebruikt in screening studies om kandidaat middelen te identificeren die het juiste PK profiel vertonen voor later gebruik in een cavia hoest model (uitvoering extern) dat de humane situatie reflecteert. Het hoest model kan niet worden uitgevoerd in ratten of muizen. |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Gebaseerd op de studiegrootte (n=2-6 dieren/groep) en op een inschatting van (inter)nationale ontwikkelingen, wordt voor de projectperiode een aantal van 800 dieren verwacht. |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | De dieren kunnen ongemak, stress of pijn ondervinden door toediening van het te testen middel. Dit kan enerzijds door de manier waarop het te testen middel wordt toegediend, bijvoorbeeld d.m.v. injectie(s), en anderzijds door het afnemen van kleine hoeveelheden bloed. |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Op grond van ervaring met dit type studies in ratten en muizen wordt het ongerief ingeschat op 80% licht en 20% als matig. |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | Alle cavia's worden in het kader van de proef of na afloop van de proef geëuthanaseerd. |

4 Drie V's

- | | |
|--|--|
| 4.1 Vervanging
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. | Is identiek aan de oorspronkelijke projectaanvraag AVD ^{5.1.1d2f} 20173904. |
| 4.2 Vermindering
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. | Is identiek aan de oorspronkelijke projectaanvraag AVD ^{5.1.1d2f} 20173904. |
| 4.3 Verfijning
Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de | Is identiek aan de oorspronkelijke projectaanvraag AVD ^{5.1.1d2f} 20173904. |

doelstellingen van het project.

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

Is identiek aan de oorspronkelijke projectaanvraag AVD 5-1 lid 2h 20173904.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD^{5.1 lid2h} 20173904-1
2. Titel van het project : Pharmacokinetic screening of pharmaceuticals
3. Titel van de NTS : Farmacokinetische screening van potentiële geneesmiddelen

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer : AVD^{5.1 lid2h} 20173904, 1^e wijziging

5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : 5.1 lid2h
 Naam contactpersoon : 5.1 lid2e
 Emailadres contactpersoon : 5.1 lid2h

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 7-8-2019
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 8-8-2019
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 14-8-2019 tot 3-10-2019
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag: 3-10-2019
 advies aan CCD: 10-10-2019

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager: nvt

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 14-8-2019
- Datum antwoord: 3-10-19
- Gestelde vragen en antwoorden:

De projectvergunning loopt nog 3 jaar (tot eind 2022), maar in bijlage 1 wordt het benodigde aantal voor de komende 5 jaar gegeven. Kunt u het benodigde totale aantal dieren onderbouwen (of aanpassen)?

Het dieraantal was inderdaad gebaseerd op 5 jaar, excuus, we hadden ons niet gerealiseerd dat de looptijd nog maar 3 jaar was. Het dieraantal is nu aangepast naar 500 dieren, zowel in Appendix 1 als in de NTS.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een wijziging op een bestaande vergunning.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project..

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang.
Zie het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (bijlage 1)
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) sluit(en) aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden (in rood de tekst uit het oorspronkelijke advies behorend bij deze projectaanvraag).

4. **Het directe doel is het bepalen van farmacokinetische eigenschappen, die een eerste indicatie geven van de biologische beschikbaarheid van stoffen. In een screening-opzet worden eigenschappen van meerdere stoffen met elkaar vergeleken met als doel stoffen te selecteren of te deselecteren voor verdere ontwikkeling tot geneesmiddel. De algemeen geaccepteerde gedachtegang hierbij is dat de biologische beschikbaarheid in proefdieren voorspellend is voor de biologische beschikbaarheid in de mens.**

Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het doel van het amendement is beschreven en goed onderbouwd. In de huidige aanvraag was de cavia als soort voor pK-studies niet opgenomen. De pK-studies voor deze dieren zijn echter wel nodig omdat cavia's kunnen hoesten, en de benodigde dosering(en) moet(en) worden vastgesteld voor het 'caviahoestmodel', dus in het dier dat ook later dat onderzoek zal ondergaan. Dit is uitvoerig toegelicht door de IvD tijdens de vergadering. Muizen en ratten zijn ongeschikt als model voor hoesten.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld).

De samenleving heeft belang bij beschikbaarheid van betere geneesmiddelen. Hier wordt een gezondheidsbelang gediend. Van ontwikkelaars van geneesmiddelen/aanbieders van stoffen wordt een aanmerkelijk economisch belang gediend. Door vroege (de)selectie van stoffen wordt het gebruik van proefdieren voor verder onderzoek beperkt, waarmee belangen van proefdieren en samenleving worden gediend. Van de indiener wordt een aanmerkelijk economisch belang gediend.

Van de proefdieren worden integriteit- en welzijn waarden aangetast.

Voor het amendement zijn de belanghebbenden en de morele waarden ongewijzigd.

6. De DEC ziet geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken

Proefopzet en haalbaarheid

7. De aanvrager heeft een lange traditie in het uitvoeren van de beschreven DMPK-studies van stoffen en screeningstudies. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager in de loop der jaren voor het uitvoeren van deze projectaanvraag alle relevante deskundigheid en vaardigheid heeft opgebouwd. De ervaring van de onderzoeksgroep met meer complexe kinetiek studies staat niet alleen borg voor een goede uitvoering maar ook voor een goede aansluiting bij (al dan niet) wettelijk verplicht vervolgonderzoek door de geneesmiddel ontwikkelaar.

Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.

8. De aanvraag betreft het verkrijgen van farmacokinetische (DMPK) gegevens van reeksen van twee of meer nieuwe stoffen waarvan geen in vivo data bekend zijn (first in animal studies). Deze stoffen zijn kandidaat geneesmiddelen en de verzamelde DMPK gegevens zijn van belang voor selectie/deselectie van stoffen voor verdere ontwikkeling als geneesmiddel voor de mens door farma bedrijven. Het gaat hierbij dus om een stap in het vroege ontwikkelingstraject van geneesmiddelen.

De indiener van de projectaanvraag is niet de geneesmiddelontwikkelaar maar voert de beschreven screeningstudies uit voor anderen. De aanvraag betreft een 5.1 lid2h project waarin de exacte aard van de te testen stoffen nog niet bekend is. Hoewel de beschreven screeningstudies volgens dezelfde hoofdlijnen verlopen, wordt elke test toegesneden op de specifieke stof en vraag. Hiervoor is onder research strategy een procedure beschreven waarin samen met de opdracht gevende partij noodzakelijke stofgegevens en beoogde indicatie worden betrokken bij het ontwerpen van de optimale dierproef die wordt vastgelegd in een werkprotocol. Dit werkprotocol wordt voorafgaand aan de uitvoering, getoetst door de IvD. De DEC acht deze procedure deugdelijk. In de aanvraag worden proefopzet en primaire uitkomstparameters helder beschreven en deze sluiten naadloos aan bij de doelstelling van het project. De DEC is overtuigd van de goede uitvoerbaarheid van het project. De aanvraag betreft het verkrijgen van farmacokinetische (DMPK) gegevens van reeksen van twee of meer nieuwe stoffen waarvan geen in vivo data bekend zijn (first in animal studies). Deze stoffen zijn kandidaat geneesmiddelen en de verzamelde DMPK gegevens zijn van belang voor selectie/deselectie van stoffen voor verdere ontwikkeling als geneesmiddel voor de mens door farma bedrijven. Het gaat hierbij dus om een stap in het vroege ontwikkelingstraject van geneesmiddelen. De indiener van de projectaanvraag is niet de geneesmiddelontwikkelaar maar voert de beschreven screeningstudies uit voor anderen. De aanvraag betreft een 5.1 lid2h project waarin de exacte aard van de te testen stoffen nog niet bekend is. Hoewel de beschreven screeningstudies volgens dezelfde hoofdlijnen verlopen, wordt elke test toegesneden op de specifieke stof en vraag. Hiervoor is onder research strategy een procedure beschreven waarin samen met de opdracht gevende partij noodzakelijke stofgegevens en beoogde indicatie worden betrokken bij het ontwerpen van de optimale dierproef die wordt vastgelegd in een werkprotocol. Dit werkprotocol wordt voorafgaand aan de uitvoering, getoetst door de IvD. De DEC acht deze procedure deugdelijk. In de aanvraag worden proefopzet en primaire uitkomstparameters helder beschreven en deze sluiten naadloos aan bij de doelstelling van het project. De DEC is overtuigd van de goede uitvoerbaarheid van het project.

Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. *Dit is ook het geval voor de in deze wijziging toegevoegde dieren (cavia's).*
10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.
- De dieren worden gehuisvest volgens de richtlijn.
Slechts in bijzondere gevallen wordt hiervan afgeweken (bijv. solitaire huisvesting ter voorkoming van bijtincidenten of na instrumentatie, verblijf in metabole kooi in geval excreta moeten worden verzameld). Afwijkingen worden afdoende beargumenteerd in de aanvraag en zullen nader worden onderbouwd in het werkprotocol en afgestemd met de IvD.*
- Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.*
11. 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 een of meer bekende toedieningsroutes en vervolgens het afnemen van een aantal bloedmonsters ter bepaling van de (resterende) concentratie van die stof in de circulatie. Dit wordt ingeschat als mild 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 om andere redenen tijdelijk alleen gehuisvest moeten worden (agressie, instrumentatie). Er wordt ook rekening gehouden met de situatie dat een bloedvat gecanuleerd moet worden of dat kortdurend voedseldeprivatie vereist is om de benodigde DMPK gegevens te verkrijgen. In die gevallen – van extra handelingen bovenop de stoftoediening en bloedafnames - zal het cumulatieve ongerief veelal op matig uitkomen. Dat is voorzien voor 20% van de dieren in appendix 1 & 2. Dit percentage is gebaseerd op ervaring van de afgelopen jaren. De DEC vindt dit een navolgbare schattingsgrond.*
- Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.*
12. De fysieke integriteit wordt aangetast door toediening van teststof, bloedafname, in sommige gevallen ook door chirurgische interventie (canulatie) of tijdelijke voedseldeprivatie. Gedragmatig integriteit wordt aangetast in geval van afwijkende huisvesting of instrumentatie.
- Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.*
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).
- Er wordt verwezen naar het OECD guidance document on humane endpoints (ENV/JM/MONO/ 2000/7). Deze is echter bedoeld voor 'EXPERIMENTAL ANIMALS USED IN SAFETY EVALUATION'. De DEC vraagt*

zich af of deze verwijzing terecht is. Het betreft immers geen TOX studies maar DMPK studies. Zij adviseert daarom specifieke humane eindpunten te beschrijven die gerelateerd zijn aan dit soort DMPK studies. De kans dat dieren een humaan eindpunt bereiken wordt ingeschat als <1%. De DEC acht dit realistisch omdat het standaard-technieken betreft waarmee de aanvrager veel ervaring heeft.

Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, immers zoals ook bij 4 is aangegeven kunnen muizen en ratten niet hoesten en cavia's wel. Om een effectieve dosis te kunnen bepalen via een pK-studie is het dan logisch (en goed toegelicht door de IvD) dat dan de pK studies ook in de cavia worden uitgevoerd.
15. Het aantal te gebruiken dieren voor deze wijziging is, na de door de DEC gestelde vraag over het aantal cavia's ten opzichte van de looptijd, realistisch ingeschat voor de komende drie jaar, de periode is dat het project nog is vergund. *Zie ook het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag. Er is onderbouwd waarom bij cavia's de groepsgrootte iets groter is, omdat daar minder bloedmonsters genomen kunnen worden.*
16. Het project wordt uitgevoerd in overeenstemming met de vereisten van verfijning. De experimenten worden zo eenvoudig mogelijk opgezet, met zo weinig mogelijk ongerief voor de dieren. Alleen in speciale gevallen zullen aanvullende methoden zoals canulatie, voedseldeprivatie en huisvesting in metabole kooien worden toegepast. De noodzaak hiervoor zal nader worden onderbouwd in het werkprotocol en afgestemd met de IvD. Stoffen worden in zo laag mogelijk dosering gegeven. Zo wordt de kans op (ongewenste) effecten geminimaliseerd. Verder wordt opgemerkt dat de aanvrager betrokken is bij het 'Dutch 3R center' en belang hecht aan de implementatie van best practice ontwikkelingen.
Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft aanleiding deze vraag iets anders te beantwoorden: de cavia's zullen geen voedseldeprivatie ondergaan omdat ze daar gevoeliger voor zijn.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef
18. Een screeningsstudie wordt uitgevoerd met dieren van één geslacht. Voor de meeste studies is de geslachtskeuze arbitrair. De DEC gaat er daarom van uit dat de geslachtskeuze bepaald zal worden door praktische overwegingen waaronder de beschikbaarheid van dieren en daarmee een bijdrage zal kunnen leveren aan beperking van dieren in voorraad gedood.
Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.
19. 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.

Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag. Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.

20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De wijziging is in de NTS opgenomen.

D. Ethische afweging

1. Weegt het belang van het verkrijgen van biodistributie gegevens ten behoeve van selectie of deselectie van potentiële farmaca voor de mens op tegen de aantasting van de integriteit en welzijn van de proefdieren, inclusief de 500 cavia's beschreven in de wijziging?
2. 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 aangevraagde screeningstudie is daar een voorbeeld van. Door deze dierproeven wordt de blootstelling van mensen aan onwerkzame of risicovolle stoffen beperkt, hetgeen door de DEC gezien wordt als een aanmerkelijk maatschappelijk belang, evenals de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Tegenover deze maatschappelijke belangen staat dat het doen van dierproeven op zich door een deel van de samenleving als moreel problematisch wordt gezien. De aanvrager heeft een aanmerkelijk economisch belang bij uitvoering van de beschreven dierproeven. Van de proefdieren worden zowel de fysieke als gedragsmatige integriteit aangetast en wordt het welzijn (stress, pijn, ongemak) geschaad, zij het in geringe (80%) of matige (20%) mate. Beschikbaar komen van nieuwe geneesmiddelen ter preventie of behandeling van ziekten bij mensen is van groot belang. De geneesmiddelontwikkelaar produceert daartoe middels proefdiervrije technieken (chemie, in silico, celbiologie, genetics, 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. Screening en selectie op DMPK eigenschappen is daarbij hoogst relevant. De geneesmiddelontwikkelaar besteedt die screening vaak uit aan een gespecialiseerde partij zoals de aanvrager van dit project. Zonder screening en selectie staakt het ontwikkelingsproces. Tegenover deze maatschappelijke en economische belangen van verschillende partijen die gediend worden, staat de geringe tot matige aantasting van welzijns en integriteitsbelangen van de betrokken dieren.

In aanvulling op bovenstaande afweging uit het advies bij het oorspronkelijke project het volgende. De in de wijziging beschreven dieren (cavia's) zullen specifiek worden gebruikt om pK-studies uit te voeren met middelen tegen hoesten. In dat opzicht verschilt het doel niet van het oorspronkelijke doel. Ook zijn de handelingen niet anders dan voor de beschreven dieren en is het ongerief gelijk aan dat bij de muis en de rat. De aanvrager heeft aannemelijk gemaakt dat voor specifieke vragen de muis of de rat ongeschikt is en dat de cavia een beter modeldier is voor deze specifieke klasse stoffen, die later in een hoestmodel eveneens in de cavia verder zullen worden onderzocht op werkzaamheid. De gevraagde aantallen zijn naar aanleiding van de vraag van de DEC herberekend en bijgesteld naar een verwacht gebruik voor drie jaar. Met dit amendement wordt het aantal dieren met 500 verhoogd, waarvan maximaal 20% matig

ongerief zal ondergaan. Dit doet het gewicht van de afweging iets verschuiven, maar niet zodanig dat de balans naar de andere kant doorslaat. Het maatschappelijke belang blijft zeer zwaarwegend.

3. Overwegende

1. het aanmerkelijke belang van dit screeningsonderzoek naar potentiële geneesmiddelen
 2. de goede kennis en kunde en jarenlange ervaring met dit onderzoek van de onderzoeker
 3. de goede uitvoerbaarheid en haalbaarheid van het project
 4. de afwezigheid van proefdiervrije alternatieven
 5. de toezegging van de onderzoeker om dieraantallen tot een minimum te beperken
 6. het belang dat de onderzoeker aan verfijning hecht
 7. dat humane eindpunten weliswaar nader beschreven kunnen worden, maar dat deze slechts zelden gehaald zullen worden
 8. dat honden alleen worden gebruikt als de doelstelling niet met ratten of muizen kan worden gehaald
- komt de DEC unaniem tot de conclusie dat het belang van het verkrijgen van biodistributie gegevens ten behoeve van selectie of deselectie van potentiële farmaca voor de mens opweegt tegen de aantasting van de integriteit en het welzijn van de proefdieren.

Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat ook het in deze wijziging beschreven gebruik van de cavia's voor pK-studies, met het doel de juiste dosering(en) vast te stellen voor het hoestmodel, een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren, inclusief de 500 toegevoegde cavia's. Het gebruik van de extra proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 Provide the title of the project.

Pharmacokinetic screening of pharmaceuticals.

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Introduction:

The development of new medicines for treatment of human diseases, either chemical entities or biological entities (further to be referred as Test Substances) requires a long research period of many years. The development process is divided into different steps and includes computational chemistry, compound binding studies, functional biological screens, in vitro assays and ex-vivo assays using cell or tissue cultures. The final research phase before entering preclinical development will include efficacy of the new Test Substance in a suitable disease model and assessment of the first indication for adverse effects. However, in early development and without using in-vivo research, the bioavailability of such test substances is nearly impossible to determine. It is therefore important to determine the Pharmacokinetics (PK) of the Test Substance in relation to the proposed treatment route and mode of action in-vivo. In this early stage, the developing company has developed a (small) portfolio of Test Substance candidates sometimes with small structural variations of the Test Substance. These might be small differences in chemical structure or small changes causing differences in affinity in the case of antibodies.

It is then that the first in-vivo screening studies are warranted to make a selection of the Test Substance with the most promising PK profile for further research like efficacy and early toxicology assessments. In these PK studies, the bioavailability, preferred route of administration, half-life of the Test-Substance and first indications of tolerability and/or adverse effects are investigated. For this research, the participation of specialized and experienced companies, so called 5.1 lid2h, is often asked. The information derived from these experiments are used to select the preferred candidate, administration route and dose precluding unsuitable candidates from further development. This in turn will reduce the number of animals to be used in future preclinical studies.

The in vivo studies requested in this project application are limited to Drug Metabolism Pharmacokinetic (DMPK) studies. This project proposal describes the first in-vivo screenings with limited numbers of animals (2 - 24 animals per group) for customers aiming to establish the first in-vivo profile.

Background:

5.1 lid2h is a Dutch subsidiary of 5.1 lid2h. As an 5.1 lid2h in the Netherlands specializes in safety research for new and existing drugs, chemical substances and agrochemical products. Clients are pharmaceutical, chemical and agro-chemical companies worldwide. 5.1 lid2h is both GLP (Good Laboratory Practice) and AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) certified.

5.1 lid2h scientists have a broad experience in different aspects of the pharmaceutical and chemical development processes and are therefore able to provide clients with expert advice on the studies required including the design and execution of such studies, and the interpretation of the results. They are also able to provide expert advice at key decision points of drug discovery and development, and of chemical registration processes.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focused on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The objective of this project is to (de-)select preclinical candidates based on their PK profile in rat, mouse or guinea pig and/or dog. This will enable and support drug design programs for the development of test substances (pharmacological and biological entities) to be used for treatment of human diseases. The program of work defined under this project proposal will take place early in the discovery stage (i.e. pre-clinical candidate selection and improvement).

The aim of these first in-vivo studies is to establish bio-availability of test substances via determination of pharmacokinetic parameters (C_{max} and AUC in plasma/blood and/or tissues and/or excreta) and based on this (de-)select compounds for further development and/or to select the most optimal route, dose level or formulation.

The technical execution of the studies are described in Standard Operating Procedures.

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

The principal benefit of the project is the provision of data to facilitate decisions on selecting the optimal test substance, route and dose of test substances to which humans will eventually be exposed as part of a treatment for a specific disease. The information derived from these studies will also be used to preclude unsuitable candidates from further development. For these purposes, the use of animals to develop future effective and safe treatments of human diseases is considered socially relevant. In addition, performing

screening studies will reduce the use of animals in the later-stage development process.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

General strategy to design the study plan

For each individual PK study, the design and experimental work is documented in a study plan. This is authorized by the Study Director (SD) with respect to the scientific objectives, project compliance and the 3Rs before scientific procedures commence, and is reviewed by the Animal Welfare Body (AWB). All known test substance characteristics and available background information will be taken into account in the design of the study (see 3.4.2) including dose level setting. Dose levels are chosen based on the intended therapeutic dose and pharmacodynamics information available, to preclude any toxicity from occurring. Based on the available information the most appropriate study design will be determined. Studies are designed to obtain a maximum amount of data from the smallest number of animals. In general, the number of animals used for each study is considered to be the minimum needed to meet the aim of the study.

The selection of the animal species will be in principle rodents (rats, mice or guinea pigs only) and or dogs determined (inter alia) by:

- Intended use of the substance;
- Potential pharmacodynamic characteristics of the substance;
- In vitro metabolism data of the substance;
- Potential side effects.

The PK studies tend to be tested in the pharmacodynamics species of choice, so dose predictions for efficacy can be made. Efficacy animal models are usually rat, mice or guinea pig models, depending on the specific target receptor or enzyme of interest. Thus the use of a specific efficacy model will be a driver for the choice of rodent. Secondly, cell biology or biochemical assays with human and rodent cell lines will give an indication which rodent cell/protein behaves like the human. In some cases there is more sequence homology of the human receptor/enzymes to one species over the other. Dogs can be chosen in case there is a disconnect between in-vitro metabolism between human and rodents, or where there is specific intended use (e.g. compounds that are specifically developed to increase the oral bioavailability over the GI tract), or potential side effects (e.g. cardiovascular).

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

Prior to the start of the in vivo study the following items are required:

- 1) **Substance identity:** a unique identifier (e.g. 5.1 lid2h structural formula) for the chemical or biological identity of the test substance is determined at this stage.
- 2) **Intended use of the substance and stage of drug development phase:** use in humans for treatment of diseases and studies needed in discovery/screening phase.
- 3) **Most relevant route of exposure:** is generally also used in animal testing. If justified, another less relevant route of exposure may be chosen, e.g. based on technical feasibility / practicality of the testing. In such case, it will be ensured that the study remains valid for its intended use. Sometimes multiple routes of exposure are relevant.
- 4) **Availability of other information:** additional information like physico-, chemical and/or biological information may be collected, like IC50 data from cell assays. This may be used to help drafting an optimal study design and may preclude duplication of studies.
- 5) **Laboratory animal species/strain:** In principle rodents (rats, mice or guinea pigs) are to be selected. Only in case of specific study requirements the use of dogs is warranted (e.g. compound metabolism, physiology of organs, potential side effects).

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

Process and content of a study

In general, each in-vivo study consist of different phases (details per type of study are included in the Appendices):

- Acclimation phase: animals will be habituated to their environment, diet etc., which promotes both animal welfare and reproducible experimental results.
- Test phase: Test substances and, if needed, positive and/or negative (vehicle) control substances are administered by scientifically relevant routes, followed by clinical

observations, and collection of blood and optional other body fluids, excreta and/or organs/tissues for subsequent analysis.

- Recovery phase: In case of dogs, a recovery phase of at least two weeks will be used in between different studies. Dogs will only be re-used in case the discomfort has not exceeded moderate.

Usually a single dose will be administered using varying routes and/or doses. Only in specific cases (where compound accumulation is a potential concern), repeated dosing for maximally one week may be necessary to reach maximal plasma levels. The route and frequency of administration will be detailed in the study plan. Treatment in fasted or fed animals is possible, depending on substance characteristics. Guinea pigs are more sensitive for diet restrictions and will not be fasted. All treatment specifications and justifications will be documented in the study plan and is subject to review of the Animal Welfare Body according to Wod art 10.1.3.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Pharmacokinetic screening in rodents
2	Pharmacokinetic screening in dogs

This project consists of 2 appendices as summarized below. A more detailed description is given in Appendices 1 and 2. In most cases rodents are the preferred species for first PK studies, but depending on the intended use of the compound, pharmacodynamics characteristics or metabolism of the compound, dogs might be needed instead of rodents. Occasionally, PK studies in rodents might be followed by PK studies in dogs for a selection of test substances.

- Appendix 1: Pharmacokinetic screening in rodents
- Appendix 2: Pharmacokinetic screening in dogs

Appendix 1 –Pharmacokinetic testing in rodents: Basic kinetic parameters determined in these studies will provide information on the availability of the Test Substance in blood / organs, half-life and potential for accumulation of the test substance in tissues and/or organs and the potential of biotransformation following exposure to the test substance. Kinetics will help to determine the optimal route and dose for further evaluation of the test substance and potential (unwanted) side effects. This will help the client in selecting the most promising candidate (whether or not a candidate should be developed further), selection of formulations, treatment regimens, dose levels and/or routes of administration.

Appendix 2 – Pharmacokinetic testing in dogs: Similar type and goal of studies as Appendix 1. Studies will be executed in dogs; depending on the intended use of the compound, pharmacodynamics characteristics, metabolism of the compound, or potential side effects, dogs can be the appropriate species to screen compounds for PK characteristics. This rationale for the use of dogs needs to be well-defined and documented.



Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Pharmacokinetic screening in rodents

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The in vivo studies requested in this project application are limited to Drug Metabolism Pharmacokinetic (DMPK) studies. (DM)PK studies are conducted to obtain the first in vivo information on bioavailability of test substances. This information is used to support candidate selection (whether or not a candidate test substance should be developed further). Furthermore, kinetics may help to predict the dose for future efficacy and possible toxicology studies by demonstrating that the test animals are systemically exposed to the test substance, and by determining half-life, optimal route and circulating entities (parent substance/metabolites). Basic kinetic parameters determined in these studies will also provide information on the potential for accumulation of the test substance in tissues and/or organs and the potential of biotransformation following exposure to the test substance.

In addition, pharmacokinetic studies will provide data to facilitate:

- selection of formulations;
- selection of treatment regimens;
- selection of dose levels or routes of administration.

Primary outcome parameters: concentration of test substance in blood (or other excreta) by C_{max}, AUC, t_{1/2} values.

In order to study the kinetics of a test substance, it is administered to animals by a relevant route,

followed by observation of the animals and blood sampling at specific time points. Optionally sampling of excreta and/or organs/tissues at specific time points, and possible collection of other body fluids for subsequent analysis can be conducted. The study design depends upon which kinetic parameter needs to be studied (Absorption, Distribution, Metabolism and/or Excretion). If absorption or excretion are the primary parameters, blood and plasma C_{max} and AUC data will be sufficient; if distribution or organ penetration needs to be studied, tissue sampling is necessary; if metabolism is of concern, then excreta might be collected as well. The specifications will be motivated and defined in the study plan and discussed with the AWB.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

During the study the following animal procedures may be conducted:

- *Acclimation phase:* animals will be habituated to their environment, diet etc., which promotes both animal welfare and reproducibility of experimental results. The acclimation phase will be at least 5 days.

- *Administration:* to achieve the study objectives animals will be dosed with the test substance or receive vehicle¹ or positive control substances (e.g. already marketed drugs). In rats and mice, substances can be administered by several routes, including but not limited to: oral (gavage, capsule, dietary) / by injection (intramuscular, intravenous, intra-arterial, perivenous, subcutaneous, intraperitoneal, intradermal) or alternatively by inhalation (nose only) / dermal (topical) / intra-intestinal via implanted cannula / buccal (oromucosal) / ocular / intranasal / intratracheal / rectal / vaginal / (amongst others), and by infusion (intravenous, intra-arterial).

- In guinea pigs, substances can be administered by several routes, including but not limited to: oral (gavage, dietary) / by injection (intramuscular, intravenous, subcutaneous, intraperitoneal, intradermal) / dermal (topical) / ocular / intranasal / intratracheal / rectal / vaginal / (amongst others).

¹*Vehicle administration:* in rare occasions, a vehicle needs to be used which has not been used before in this facility. This can be the case with test compounds that have low water solubility that need to be administered intravenously in order to determine its absolute bioavailability. In those occasions, in first instance literature information will be obtained but if this gives insufficient information the vehicle will be administered in maximally 2 animals prior to any test substance dosing; the animals will be observed frequently after administration, up to 24 hours after administration. In case of adverse effects, humane endpoints (ENV/JM/MOMO/2000/7) will be applied when appropriate. Vehicle administration may also be warranted if endogenous levels of the test compound are present.

The most relevant route of exposure in humans is in most cases also the route of administration in the animal study. But for first application, comparison with the i.v. route or other administration routes relevant for human use (for instance, to compare with the intended parenteral human route of exposure) can be used in order to determine absolute bioavailability/absorption. Unless otherwise specified, the administration of substances and the sampling procedures will be conducted such that the discomfort will be no more than transient mild and that no lasting harm occurs.

Frequency of administration will be a single dose in most cases; optionally a repeated dose might be necessary in case accumulation of the test compound is of concern.

For a repeated dose study, the most commonly used frequency is once daily. The frequency is based upon available literature, in silico and/or in-vitro data, expected dosing regime in humans, experience, animal welfare considerations and advice of the AWB.

The duration of treatment for this application will be maximally one week with a maximum of 14 applications (twice daily for one week).

- *Clinical observation:* clinical signs will be assessed twice daily for the first application followed by at least once daily to assess the health condition of the animal. Frequency of observations may be increased in case severity is increasing from mild to moderate.

- *Blood sampling in rats and mice:* blood may be sampled on one or more occasions (under anesthesia if applicable) using peripheral / superficial vessels, major blood vessels / an implanted cannula / cardiac puncture (procedure under terminal anesthesia). *Blood sampling in guinea pigs:*

blood may be sampled on one or more occasions (under anesthesia if applicable) using peripheral / superficial vessels, major blood vessels / an implanted cannula / cardiac puncture (procedure under terminal anesthesia). More specific, blood can be collected preferably from the saphenous, tarsal, or jugular vein. The purpose of blood collection is to derive concentration of test substance in blood for kinetic parameters. The amount of blood collected will remain within the internationally accepted limits (Diehl et al., J. Appl. Toxicol., 2001, 21, 15-23), according to animal ethical standard procedures.

- *Body fluids or excreta sampling:* may be performed optionally as follows: excreta (faeces) and/or urine using metabolism cages for max 1 day (24h).

- *Confinement and restraint:* one or more of the following methods may be used: manual restraint for oral dosing, short term separation (e.g., for observation purposes), 24 h metabolism cages, single housing in case of male mice fighting or with scientific justification like dermal application or permanently implanted catheters.

- *Food and/or water deprivation:* may be withheld, and will be clearly documented in the study plan. Treatment under fasted or fed conditions might be preferred depending on compound characteristics. The duration of fasting will be according to best practice procedures with maximum withholding period for water of 8 hours and 24 hours for food in case of rats. In case of mice there will be no withholding of water and a maximum of 6 hours withholding of food, where applicable. Guinea pigs are more sensitive for diet restrictions and will not be fasted.

- *Removal of hair:* may be performed by chemical or mechanical procedures, in order to facilitate test substance administration (e.g. dermal dosing), to facilitate local observations and better exposure to light/air, as preparation for surgery and to improve recovery of the underlying surface.

- *Temperature:* body temperature (e.g. rectal) may be measured using suitable devices.

- *Surgical preparation:* rats may undergo surgical cannulation of blood vessels and or ducts with or without exteriorization. An adequate recovery time will be implemented.

All the above-mentioned procedures are described in Standard Operation Procedures (SOPs) which contain best practice procedures and are, *inter alia*, reviewed by Animal Welfare Body and Study Director.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Screening studies are used to preclude unsuitable candidates from further development based on pharmacokinetic characteristics like bioavailability and/or to select the most optimal route, dose level or formulation. Since screening studies are used as a selection tool whereby compounds (or routes, doses, formulations) are ranked compared to one another, the determination of definite pharmacokinetics is less important. Therefore, the number of animals can be kept as low as possible (see Section B, Table 1), and 2-4 animals per group will be sufficient to give information for ranking of compounds (or routes, doses, formulations). In case of mice, more animals are needed as only a limited amount of blood can be collected from these small animals. In case of guinea pigs more animals may be included as only a limited number of blood collections can be performed per animal. Depending on the detection limit/sensitivity of the required biomarkers/measurements more animals may be required for a proper scientific evaluation, up to the maximum mentioned in Table 1.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Species and origin:

Rodents: Mice, rats and guinea pigs, obtained from certified international breeders/suppliers and transported by a certified and approved animal courier. Surgery models may be used and might be done internal or external (e.g. with implanted jugular vein catheter). The preferred species will be the rat, since it is possible to obtain multiple blood samples from one animal.

In some cases, it might be necessary to generate pharmacokinetic data in genetically-modified animals, e.g. if future efficacy, toxicity or pharmacology studies will be performed in genetically-modified animals and supporting pharmacokinetic data are necessary for data interpretation. Genetically altered rodent strains used under this protocol are not expected to exhibit any harmful phenotype.

The preferred species is the rat but selection of mice or guinea pig might be necessary for the study depending on the following:

- Intended use of the substance;
- Potential pharmacodynamic characteristics of the substance;
- In vitro metabolism data of the substance;
- In addition, the guinea pig will be specifically used in screening studies to identify compounds that have

the right PK profile for subsequently use in a guinea pig cough model (performed externally) reflecting the human situation. This cough model cannot be performed in rats or mice.

The PK studies tend to be tested in the pharmacodynamics species of choice, so dose predictions for efficacy can be made. Efficacy animal models are usually rat or mice models, depending on the specific target receptor or enzyme of interest. Thus the use of a specific efficacy model will be a driver for the choice of rodent. Secondly, cell biology or biochemical assays with human and rodent cell lines will give an indication which rodent cell/protein behaves like the human. In some cases there is more sequence homology of the human receptor/enzymes to one species over the other. This species will then be chosen for the PK screening as well. Differences in in-vitro metabolism between human, rat and mice can be a driver for choice of rodent as well.

Age and sex:

In general the age of the animals should be representative for the human situation. Usually, young adult animals used, but if necessary the age of the animals may be adapted to the required study design.

Usually one sex is used for screening PK studies, since they are used as a screening tool and not for providing definitive pharmacokinetic characterizations. Unless test substance characteristics warrant the need for a specific sex, there is no sex preference for this type of study and either sex can be used.

Number of animals:

In a screening study, usually compounds of the same chemical class or for the same therapeutic indication will be tested. The total number of groups, and therefore total number of animals, per study depends on the number of compounds, routes, dose levels or formulations tested in one study plan (each compound, or dose, or route or formulation tested will be 1 group). The total number of animals per screening study (plan) is limited to the maximum number of animals mentioned in Table 1.

Table 1: maximum number of rodents per screening study:

Screening in rodents per study:	Number of animals/ group		
	N per group:	Max. no animals per screening study	Estimated total number of animals per 5 years
rats	2-4 animals/group ¹ .	60	3000
mice	2-24 animals/group ^{1,2}	200	1000
guinea pigs	2-6 animals/group ^{1,3}	24	500 ⁴

Note:

- 1) The number of animals in a group for screenings studies is smaller than for standard guideline studies, e.g. in a default 28-day duration regular toxicology study the number of animals per group is 5-10 main animals/sex/group = 10-20 animals/group.
- 2) In case of mice more animals will be included as only a limited amount of blood can be collected from these small animals. Sample volumes will be kept as small as possible (depending on the compound and the sensitivity of available bioanalytical method) to keep the number of additional animals as low as possible. When higher sample volumes are required, the number of animals needs to be increased accordingly up to the maximum number mentioned in the table.
- 3) In case of guinea pigs more animals may be included as only a limited number of blood collections can be performed per animal.
- 4) This is the number of animals estimated for the remaining project proposal period (3 years)

In case of unexpected adverse effects, additional animals may be required, either as addition or replacement using a lower dose of test substance or an alternative vehicle. This will be verified by the Animal Welfare Body and may imply an amendment to the project. In case of death of an animal(s), which is not related to the test substance or treatment procedures, this animal(s) may be replaced by a spare animal.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number

5.1 lid2h is actively involved within the Dutch Three R center, and regularly interacts with global regulatory agencies and the European Lab Animal Science (FELASA) network, the company is well positioned to encourage adoption and improvement of animal welfare best practice within regulatory testing and **5.1 lid2h**

In the light of the NCad guideline 'Transitie naar proefdiervrij onderzoek', study designs are reviewed at regular intervals (in conjunction with changing guidelines or recommendations) as well as on an ad-hoc basis (in conjunction with the client) to incorporate available refinements, to minimise animal numbers or to reduce severity of discomfort. The company is actively involved in cross-industry initiatives, aimed at sharing best practice and application of the 3Rs.

Replacement

Before starting the first in-vivo screenings, a lot of data are already available from by in silico studies and in vitro experiments. A typical screening cascade within Drug Discovery will include design and synthesis by computer-aided drug discovery (CADD) and calculation of physicochemical properties (clogP, logD, MW), functional biological screens (e.g receptor binding, efficacy and selectivity screens) and in-vitro DMPK assays (permeability, microsomal metabolism, solubility).

However, so far, no alternatives are available for the described DMPK studies. For meaningful and reliable evaluation of compound kinetics, the target physiological systems must be intact, with complete neural and humoral controls modulating any responses. In vitro and ex-vivo test systems in isolation are inadequate for comprehensive determination of kinetics.

Reduction

The minimal number of animals used in a screening study is based upon common practice for blood sampling. Studies are designed to obtain maximum data from the smallest number of animals. In general, the number of animals used in each study is considered to be the minimum needed to rank-order compounds based on pharmacokinetic parameters. As mentioned above, study designs are further refined, to identify the optimum animal number to achieve study objectives. Based upon the conducted screening studies described in this appendix, future efficacy, pharmacological and toxicological studies can be designed with the lowest number of animals and with (in principle) no adverse effects with the selected test-substances in the optimal dose.

Refinement

Animal welfare is of utmost importance and Good Surgical Practice will be observed for any animal undergoing surgical procedures. In addition, care is taken to provide as much environmental enrichment as possible (e.g. play items and shelters for rodents) and the company has working parties that regularly test and evaluate environmental enrichment items or practices.

Measures are in place to minimise animal suffering, the results of each study influencing the design and dose-selection in subsequent related studies. This allows progressive characterization of adverse effects so that unnecessary testing or use of inappropriate dosages can be avoided.

The involvement of experienced and qualified (art. 13f2a and b) animal care staff occurs at an early stage, so that advice can be given on implementation of the 3Rs and any appropriate refinements are being implemented.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The majority of animals are not expected to show signs of (severe) effects that have impact on their general well-being. In the event of an animal showing unexpected signs of an adverse reaction, immediate veterinary advice will be sought (e.g. modification of study design/ withdrawal from treatment, abrogation of the study) or humane end-points (ENV/JM/MOMO/ 2000/7) applied where appropriate.

Studies involving potential therapeutic agents (pharmaceuticals) may produce pharmacological or pharmacodynamic effects with certain discomfort (max moderate), but these would not be expected

to persist for longer than 24 hours. Unless otherwise specified, the administration of substances and the sampling procedures will be undertaken using a combination of volumes, routes and frequencies that of themselves will result in no or at most transient mild or moderate discomfort and no lasting harm.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Repetition of studies will be avoided as much as possible. The study history of the test substance will be queried (to complete the 6 item checklist mentioned in the Project Proposal) from the sponsor to guarantee optimal study design.

Repetition of a certain study could occur on incidental basis, for example when a previous study failed because of a test substance contamination issue.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Male mice, surgically-instrumented animals and animals with dermal/topical applications will be single-housed in order to prevent fighting and/or damage to the instrumentation or dermal application. Animals will have visual, auditory and olfactorial contact where possible. In addition, for collection of excreta animals will be single-housed in metabolism cages for a maximum of 24h. Other housing and care conditions will be in accordance with Directive 2010/63/EU.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Anesthesia will be used during surgery, prior to euthanizing animals and/or during blood collection (if applicable for the procedure). Analgesia might be used prior to and after surgery, this will depend on the type of surgery.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Adverse effects caused by the test substance might be observed. In addition, some adverse effects caused by the method of dosing, sampling of body fluids, single housing/metabolism cage, surgical instrumentation and restraining could occur.

Explain why these effects may emerge.

For test substances that are at an early stage of development, there will be little or no animal data available. Hence, occasionally unexpected adverse effects might occur.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

A careful approach will be adopted to minimize the severity of any discomfort. Animals are being monitored, and humane end-points (ENV/JM/MOMO/ 2000/7) will be applied where appropriate. In response to developing unexpected discomfort, involvement of the Animal Welfare Body and veterinarian will be sought at the earliest possible stage when potential issues of concern arise or when unusual events (within the context of the study) first occur.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Animals showing pain, distress or discomfort which is considered not transient in nature or is likely to become more severe, will be killed for humane reasons, based on OECD guidance document on humane endpoints (ENV/JM/MONO/ 2000/7).

Indicate the likely incidence.

The incidence is estimated as minimal and is expected < 1%

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The expected cumulative discomfort for these studies will be mild or moderate. For the large majority of studies it is not expected that the severity will increase by test substance related effects. In very rare cases the discomfort might increase by test substance related effects.

Table 3: Percentage of animals & expected levels of discomfort

Species used in DM(PK) studies:	% mild	% moderate
Rats, mice and guinea pigs	80	20

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Animals will be killed at the end of the treatment period for of collection of organs/tissues,.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



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
- 1.2 Looptijd van het project
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5)

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
- 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 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- De wijziging van het project "Farmacokinetische screening van potentiële geneesmiddelen" heeft betrekking op het gebruik van cavia's in screening studies. Het doel van het project blijft hetzelfde.
- Het proefdier (cavia) krijgt één of meerdere doseringen van het kandidaat middel waarna op verschillende tijdstippen bloed wordt afgenomen (conform Good Practice). In het laboratorium wordt vervolgens bepaald hoeveel van het middel in het bloed terug is te vinden. Dit wordt farmacokinetisch (PK) onderzoek genoemd. Tevens kunnen er ook organen worden verzameld voor PK.

- | | |
|---|---|
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Dit project draagt bij aan de ontwikkeling van nieuwe humane geneesmiddelen. De cavia wordt specifiek gebruikt in screening studies om kandidaat middelen te identificeren die het juiste PK profiel vertonen voor later gebruik in een cavia hoest model (uitvoering extern) dat de humane situatie reflecteert. Het hoest model kan niet worden uitgevoerd in ratten of muizen. |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Gebaseerd op de studiegrootte (n=2-6 dieren/groep) en op een inschatting van (inter)nationale ontwikkelingen, wordt voor de projectperiode een aantal van 500 dieren verwacht. |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | De dieren kunnen ongemak, stress of pijn ondervinden door toediening van het te testen middel. Dit kan enerzijds door de manier waarop het te testen middel wordt toegediend, bijvoorbeeld d.m.v. injectie(s), en anderzijds door het afnemen van kleine hoeveelheden bloed. |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Op grond van ervaring met dit type studies in ratten en muizen wordt het ongerief ingeschat op 80% licht en 20% als matig. |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | Alle cavia's worden in het kader van de proef of na afloop van de proef geëuthanaseerd. |

4 Drie V's

- | | |
|--|---|
| 4.1 Vervanging
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. | Is identiek aan de oorspronkelijke projectaanvraag AVD 5.1 lid 2 0173904. |
| 4.2 Vermindering
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. | Is identiek aan de oorspronkelijke projectaanvraag AVD 5.1 lid 2 0173904. |
| 4.3 Verfijning
Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de | Is identiek aan de oorspronkelijke projectaanvraag AVD 5.1 lid 2 0173904. |

doelstellingen van het project.

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

Is identiek aan de oorspronkelijke projectaanvraag AVD **5.1102H** 20173904.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

Van: Info-zbo
Aan: 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: Aanhouden AVD 5.1 lid2e 20173904-1
Datum: vrijdag 11 oktober 2019 16:58:04

10

Geachte 5.1 lid2e ,
Nog een aanvulling op onderstaande vragen: In de NTS zouden we ook graag een uitleg willen zien wat het "hoestmodel" is, dit is voor de leek niet duidelijk.
Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Van: Info-zbo

Verzonden: vrijdag 11 oktober 2019 16:53

Aan: 5.1 lid2e

CC: 5.1 lid2e

Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2e 20173904-1

Geachte 5.1 lid2e

9

Wij hebben op 26 juli 2019 een wijziging ontvangen op uw projectvergunning dierproeven. Het gaat om "Pharmacokinetic screening of pharmaceuticals" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2e 20173904. Uw wijziging is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD 5.1 lid2e 20173904-1. 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:

Onduidelijkheden

- Wij zijn ons er van bewust dat dit in tegenspraak is met wat op ons aanvraagformulier vermeld staat, maar wij willen u vragen een volledig ingevulde NTS in te sturen. De NTS dient zelfstandig leesbaar te zijn.
- Kunt u aangeven wat de reden is van de toevoeging van de 500 cavia's?

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 zal worden besproken in de CCD vergadering van 18 oktober 2019. Indien u uiterlijk 17 oktober 2019 uw antwoorden aan ons toezend kunnen wij deze inbrengen in de vergadering.

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

**Advies aan CCD**

Datum 11 oktober 2019

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag wijziging projectvergunning
AVD20173904-1Instelling: **5.1 lid2h**Onderzoeker: **5.1 lid2e**

Voor aanvraag AVD20173904 is een wijzigingsaanvraag ingediend. Deze is geregistreerd als AVD20173904-1. Het project is getiteld: Pharmacokinetic screening of pharmaceuticals.

Proces

Op dit project zijn geen eerdere meldingen/wijzigingen geweest. De aanvrager is gevraagd een volledig ingevulde NTS in te dienen, die te begrijpen is door de leek. In Sectie 4 wordt namelijk verwezen naar een de oorspronkelijke projectaanvraag. De NTS dient eigenstandig leesbaar te zijn.

De CCD kan uit de ontvangen stukken niet goed opmaken wat de reden is van het toevoegen van 500 cavia's. Uit het DEC-advies blijkt dat zij deze informatie blijkbaar wel hebben, want het staat benoemd in het DEC-advies. De aanvrager wordt verzocht dit toe te voegen aan de aanvraag.

Inhoud wijziging

Aan Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 worden 500 cavia's toegevoegd.

CITAAT Sectie B bijlage 3.4.4.1

In addition, the guinea pig will be specifically used in screening studies to identify compounds that have the right PK profile for subsequently use in a guinea pig cough model (performed externally) reflecting the human situation. This cough model cannot be performed in rats or mice.

heeft opmaak toegepast: Engels (Verenigde Staten)

heeft opmaak toegepast: Engels (Verenigde Staten)

Reden wijziging

Citaat uit DEC advies *Het doel van het amendement is beschreven en goed onderbouwd. In de huidige aanvraag was de cavia als soort voor pK-studies niet opgenomen. De pK-studies voor deze dieren zijn echter wel nodig omdat cavia's kunnen hoesten, en de benodigde dosering(en) moet(en) worden vastgesteld voor het 'caviahoestmodel', dus in het dier dat ook later dat onderzoek zal ondergaan. Dit is uitvoerig toegelicht door de IvD tijdens de vergadering. Muizen en ratten zijn ongeschikt als model voor hoesten.*

Met opmerkingen **5.1 lid2e**: Ben ik gek, of zie ik in de stukken van de aanvrager nergens de onderbouwing van de noodzaak van de wijziging?

Beoordeling wijziging door DEC:

De DEC heeft het oorspronkelijke advies aangevuld met opmerkingen specifiek voor het amendement.

Citaten (oorspronkelijke advies rood, aanvullingen met betrekking tot de wijziging cursief):


C10 (huisvesting): De dieren worden gehuisvest volgens de richtlijn. Slechts in bijzondere gevallen wordt hiervan afgeweken (bijv. solitaire huisvesting ter voorkoming van bijtincidenten of na instrumentatie, verblijf in metabole kooi in geval excreta moeten worden verzameld). Afwijkingen worden afdoende beargumenteerd in de aanvraag en zullen nader worden onderbouwd in het werkprotocol en afgestemd met de IvD. Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.

C13 (humane eindpunten): Er wordt verwezen naar het OECD guidance document on humane endpoints (ENV/JM/MONO/2000/7). Deze is echter bedoeld voor 'EXPERIMENTAL ANIMALS USED IN SAFETY EVALUATION'. De DEC vraagt zich af of deze verwijzing terecht is. Het betreft immers geen TOX studies maar DMPK studies. Zij adviseert daarom specifieke humane eindpunten te beschrijven die gerelateerd zijn aan dit soort DMPK studies. De kans dat dieren een humaan eindpunt bereiken wordt ingeschat als <1%. De DEC acht dit realistisch omdat het standaard-technieken betreft waarmee de aanvrager veel ervaring heeft. Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.

C15 (vermindering): Het aantal te gebruiken dieren voor deze wijziging is, na de door de DEC gestelde vraag over het aantal cavia's ten opzichte van de looptijd, realistisch ingeschat voor de komende drie jaar, de periode is dat het project nog is vergund. Zie ook het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag. Er is onderbouwd waarom bij cavia's de groepsgrootte iets groter is, omdat daar minder bloedmonsters genomen kunnen worden.

Ethische afweging DEC (Citaat):

1. Weegt het belang van het verkrijgen van biodistributie gegevens ten behoeve van selectie of deselectie van potentiële farmaca voor de mens op tegen de aantasting van de integriteit en welzijn van de proefdieren, inclusief de 500 cavia's beschreven in de wijziging?
2. 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 aangevraagde screeningstudie is daar een voorbeeld van. Door deze dierproeven wordt de blootstelling van mensen aan onwerkzame of risicovolle stoffen beperkt, hetgeen door de DEC gezien wordt als een aanmerkelijk maatschappelijk belang, evenals de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Tegenover deze maatschappelijke belangen staat dat het doen van dierproeven op zich door een deel van de samenleving als moreel problematisch wordt gezien. De aanvrager heeft een aanmerkelijk economisch belang bij uitvoering van de beschreven dierproeven. Van de proefdieren worden zowel de fysieke als gedragsmatige integriteit aangetast en wordt het welzijn (stress, pijn, ongemak) geschaad, zij het in geringe (80%) of matige (20%) mate. Beschikbaar komen van nieuwe geneesmiddelen ter preventie of behandeling van ziekten bij mensen is van groot belang. De

geneesmiddelontwikkelaar produceert daartoe middels proefdiervrije technieken (chemie, in silico, celbiologie, genetics, 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. Screening en selectie op DMPK eigenschappen is daarbij hoogst relevant. De geneesmiddelontwikkelaar besteedt die screening vaak uit aan een gespecialiseerde  zoals de aanvrager van dit project. Zonder screening en selectie staakt het ontwikkelingsproces. Tegenover deze maatschappelijke en economische belangen van verschillende partijen die gediend worden, staat de geringe tot matige aantasting van welzijns en integriteits belangen van de betrokken dieren. In aanvulling op bovenstaande afweging uit het advies bij het oorspronkelijke project het volgende. De in de wijziging beschreven dieren (cavia's) zullen specifiek worden gebruikt om pK-studies uit te voeren met middelen tegen hoesten. In dat opzicht verschilt het doel niet van het oorspronkelijke doel. Ook zijn de handelingen niet anders dan voor de beschreven dieren en is het ongerief gelijk aan dat bij de muis en de rat. De aanvrager heeft aannemelijk gemaakt dat voor specifieke vragen de muis of de rat ongeschikt is en dat de cavia een beter modeldier is voor deze specifieke klasse stoffen, die later in een hoestmodel eveneens in de cavia verder zullen worden onderzocht op werkzaamheid. De gevraagde aantallen zijn naar aanleiding van de vraag van de DEC herberekend en bijgesteld naar een verwacht gebruik voor drie jaar. Met dit amendement wordt het aantal dieren met 500 verhoogd, waarvan maximaal 20% matig ongerief zal ondergaan. Dit doet het gewicht van de afweging iets verschuiven, maar niet zodanig dat de balans naar de andere kant doorslaat. Het maatschappelijke belang blijft zeer zwaarwegend.

3. Overwegende

1. het aanmerkelijke belang van dit screeningsonderzoek naar potentiële geneesmiddelen
2. de goede kennis en kunde en jarenlange ervaring met dit onderzoek van de onderzoeker
3. de goede uitvoerbaarheid en haalbaarheid van het project
4. de afwezigheid van proefdiervrije alternatieven
5. de toezegging van de onderzoeker om dieraantallen tot een minimum te beperken
6. het belang dat de onderzoeker aan verfijning hecht
7. dat humane eindpunten weliswaar nader beschreven kunnen worden, maar dat deze slechts zelden gehaald zullen worden
8. dat honden alleen worden gebruikt als de doelstelling niet met ratten of muizen kan worden gehaald komt de DEC unaniem tot de conclusie dat het belang van het verkrijgen van biodistributie gegevens ten behoeve van selectie of deselectie van potentiële farmaca voor de mens opweegt tegen de aantasting van de integriteit en het welzijn van de proefdieren.

Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat ook het in deze wijziging beschreven gebruik van de cavia's voor pK-studies, met het doel de juiste dosering(en) vast te stellen voor het hoestmodel, een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de beperkte

aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren, inclusief de 500 toegevoegde cavia's. Het gebruik van de extra proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

Terugkoppeling aan de DEC

Het DEC advies is helder en navolgbaar. De gestelde vragen en antwoorden zijn herleidbaar in het DEC advies. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen. Uit de stukken blijkt niet welke reden de aanvrager heeft om cavia's toe te voegen aan het project. 5.2 lid1

Samenvatting

De aanvrager vraagt 500 cavia's aan voor het uitvoeren van DMPK studies die niet in de muis of rat kunnen worden uitgevoerd. De daarna uit te voeren "hoeststudies", zullen niet bij deze aanvrager worden uitgevoerd. De reden voor de wijziging is niet uit de aanvraagformulieren op te maken maar leest het Secretariaat in het DEC-advies. De aanvraag wordt verzocht de reden voor de wijziging toe te voegen aan de aanvraag.

De aanvraag geeft aan dat de gebruikte cavia's gevoeliger zijn voor voedseldeprivatie en daarom voor deze dieren geen vastenperiode wordt toegepast.

De DEC heeft in het advies betreffende de oorspronkelijke aanvraag aangegeven dat de beschrijving van de humane eindpunten een niet terechte verwijzing bevat naar een OECD guidance document. De kans dat dieren een humaan eindpunt bereiken wordt ingeschat als <1%. Bij de behandeling van deze oorspronkelijke aanvraag door de CCD is hier geen vraag over gesteld. Vanwege consistentie is hier bij deze wijziging ook niet om nadere opheldering gevraagd.

Advies

Het Secretariaat 5.2 lid1

Naam proef	Diersoort	Aantal dieren	ernst
3.4.4.1 Pharmacokinetische screening in rodents	Cavia's (Cavia porcellus)	500	20% matig, 80% licht

5.2 lid1

AVD 5.1 lid2h 20173904-1 – beantwoording vragen

Wij vragen u de oorspronkelijke NTS van de aanvraag aan te passen op de punten waar de wijziging plaatsvindt. Dit liefst met een ander lettertype/kleur, zodat voor de lezer duidelijk is waar uw project over gaat en wat er is beschreven in de wijziging. Dus een volledige NTS die het volledige (gewijzigde) project weergeeft.

De oorspronkelijke NTS is gewijzigd en de wijzigingen zijn in rood weergegeven.

Daarnaast willen wij graag van u weten wat de reden is van het toevoegen van de cavia aan uw project. Wij kunnen dit nu niet uit uw aanvraag halen.

De reden is dat de cavia de kleinste diersoort is die kan hoesten. Hierdoor wordt de cavia gebruikt als farmacodynamiek (PD) model om medicijnen die hoestklachten moeten tegengaan te ontwikkelen. Om te voorkomen dat veel dieren gebruikt dienen te worden (met relatief veel ongerief en een grote hoeveelheid van de te testen stof) zullen de nieuw ontwikkelde stoffen eerst in een farmacokinetiek model worden gescreend op het beste kinetische profiel. Alleen de stoffen met een passend farmacokinetisch profiel worden verder getest in een PD model. Dit laatste gebeurt overigens extern en niet binnen 5.1 lid2h

Het volgende stond al in Appendix 1:

- the guinea pig will be specifically used in screening studies to identify compounds that have the right PK profile for subsequently use in a guinea pig cough model (performed externally) reflecting the human situation. This cough model cannot be performed in rats or mice.

Het volgende in groen is nu toegevoegd aan het project proposal:

The PK studies tend to be tested in the pharmacodynamics species of choice, so dose predictions for efficacy can be made. Efficacy animal models are usually rat, mice or guinea pig models, depending on the specific target receptor or enzyme of interest. Thus the use of a specific efficacy model will be a driver for the choice of rodent. For instance, the guinea pig will be used as a cough model, and that cannot be in rats or mice, as they are unable to cough (a guinea pig is the smallest mammal that can cough). Therefore, PK studies with medicines intended to treat cough will be performed in guinea pigs. Secondly, cell biology or biochemical assays with human and rodent cell lines will give an indication which rodent cell/protein behaves like the human. In some cases there is more sequence homology of the human receptor/enzymes to one species over the other. Dogs can be chosen in case there is a disconnect between in-vitro metabolism between human and rodents, or where there is specific intended use (e.g. compounds that are specifically developed to increase the oral bioavailability over the GI tract), or potential side effects (e.g. cardiovascular).



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 Provide the title of the project.

Pharmacokinetic screening of pharmaceuticals.

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Introduction:

The development of new medicines for treatment of human diseases, either chemical entities or biological entities (further to be referred as Test Substances) requires a long research period of many years. The development process is divided into different steps and includes computational chemistry, compound binding studies, functional biological screens, in vitro assays and ex-vivo assays using cell or tissue cultures. The final research phase before entering preclinical development will include efficacy of the new Test Substance in a suitable disease model and assessment of the first indication for adverse effects. However, in early development and without using in-vivo research, the bioavailability of such test substances is nearly impossible to determine. It is therefore important to determine the Pharmacokinetics (PK) of the Test Substance in relation to the proposed treatment route and mode of action in-vivo. In this early stage, the developing company has developed a (small) portfolio of Test Substance candidates sometimes with small structural variations of the Test Substance. These might be small differences in chemical structure or small changes causing differences in affinity in the case of antibodies.

It is then that the first in-vivo screening studies are warranted to make a selection of the Test Substance with the most promising PK profile for further research like efficacy and early toxicology assessments. In these PK studies, the bioavailability, preferred route of administration, half-life of the Test-Substance and first indications of tolerability and/or adverse effects are investigated. For this research, the participation of specialized and experienced companies, so called **5.1 lid2h**, is often asked. The information derived from these experiments are used to select the preferred candidate, administration route and dose precluding unsuitable candidates from further development. This in turn will reduce the number of animals to be used in future preclinical studies.

The in vivo studies requested in this project application are limited to Drug Metabolism Pharmacokinetic (DMPK) studies. This project proposal describes the first in-vivo screenings with limited numbers of animals (2 - 24 animals per group) for customers aiming to establish the first in-vivo profile.

Background:

5.1 lid2h is a Dutch subsidiary of **5.1 lid2h**. As an **5.1 lid2h** in the Netherlands specializes in safety research for new and existing drugs, chemical substances and agrochemical products. Clients are pharmaceutical, chemical and agro-chemical companies worldwide. **5.1 lid2h** is both GLP (Good Laboratory Practice) and AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) certified.

5.1 lid2h scientists have a broad experience in different aspects of the pharmaceutical and chemical development processes and are therefore able to provide clients with expert advice on the studies required including the design and execution of such studies, and the interpretation of the results. They are also able to provide expert advice at key decision points of drug discovery and development, and of chemical registration processes.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focused on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The objective of this project is to (de-)select preclinical candidates based on their PK profile in rat, mouse or guinea pig and/or dog. This will enable and support drug design programs for the development of test substances (pharmacological and biological entities) to be used for treatment of human diseases. The program of work defined under this project proposal will take place early in the discovery stage (i.e. pre-clinical candidate selection and improvement).

The aim of these first in-vivo studies is to establish bio-availability of test substances via determination of pharmacokinetic parameters (C_{max} and AUC in plasma/blood and/or tissues and/or excreta) and based on this (de-)select compounds for further development and/or to select the most optimal route, dose level or formulation.

The technical execution of the studies are described in Standard Operating Procedures.

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

The principal benefit of the project is the provision of data to facilitate decisions on selecting the optimal test substance, route and dose of test substances to which humans will eventually be exposed as part of a treatment for a specific disease. The information derived from these studies will also be used to preclude unsuitable candidates from further development. For these purposes, the use of animals to develop future effective and safe treatments of human diseases is considered socially relevant. In addition, performing

screening studies will reduce the use of animals in the later-stage development process.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

General strategy to design the study plan

For each individual PK study, the design and experimental work is documented in a study plan. This is authorized by the Study Director (SD) with respect to the scientific objectives, project compliance and the 3Rs before scientific procedures commence, and is reviewed by the Animal Welfare Body (AWB). All known test substance characteristics and available background information will be taken into account in the design of the study (see 3.4.2) including dose level setting. Dose levels are chosen based on the intended therapeutic dose and pharmacodynamics information available, to preclude any toxicity from occurring. Based on the available information the most appropriate study design will be determined. Studies are designed to obtain a maximum amount of data from the smallest number of animals. In general, the number of animals used for each study is considered to be the minimum needed to meet the aim of the study.

The selection of the animal species will be in principle rodents (rats, mice or guinea pigs only) and or dogs determined (inter alia) by:

- Intended use of the substance;
- Potential pharmacodynamic characteristics of the substance;
- In vitro metabolism data of the substance;
- Potential side effects.

The PK studies tend to be tested in the pharmacodynamics species of choice, so dose predictions for efficacy can be made. Efficacy animal models are usually rat, mice or guinea pig models, depending on the specific target receptor or enzyme of interest. Thus the use of a specific efficacy model will be a driver for the choice of rodent. For instance, the guinea pig will be used as a cough model, and that cannot be in rats or mice, as they are unable to cough (a guinea pig is the smallest mammal that can cough). Therefore, PK studies with medicines intended to treat cough will be performed in guinea pigs. Secondly, cell biology or biochemical assays with human and rodent cell lines will give an indication which rodent cell/protein behaves like the human. In some cases there is more sequence homology of the human receptor/enzymes to one species over the other.

Dogs can be chosen in case there is a disconnect between in-vitro metabolism between human and rodents, or where there is specific intended use (e.g. compounds that are specifically developed to increase the oral bioavailability over the GI tract), or potential side effects (e.g. cardiovascular).

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

Prior to the start of the in vivo study the following items will be evaluated:

- 1) **Substance identity:** a unique identifier (e.g. 5.1 lid2h, structural formula) for the chemical or biological identity of the test substance is determined at this stage.
- 2) **Intended use of the substance and stage of drug development phase:** use in humans for treatment of diseases and studies needed in discovery/screening phase.
- 3) **Most relevant route of exposure:** is generally also used in animal testing. If justified, another less relevant route of exposure may be chosen, e.g. based on technical feasibility / practicality of the testing. In such case, it will be ensured that the study remains valid for its intended use. Sometimes multiple routes of exposure are relevant.
- 4) **Availability of other information:** additional information like physico-, chemical and/or biological information may be collected, like IC50 data from cell assays. This may be used to help drafting an optimal study design and may preclude duplication of studies.
- 5) **Laboratory animal species/strain:** In principle rodents (rats, mice or guinea pigs) are to be selected. Only in case of specific study requirements the use of dogs is warranted (e.g. compound metabolism, physiology of organs, potential side effects).

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

Process and content of a study

In general, each in-vivo study consist of different phases (details per type of study are included in the Appendices):

- Acclimation phase: animals will be habituated to their environment, diet etc., which

- promotes both animal welfare and reproducible experimental results.
- Test phase: Test substances and, if needed, positive and/or negative (vehicle) control substances are administered by scientifically relevant routes, followed by clinical observations, and collection of blood and optional other body fluids, excreta and/or organs/tissues for subsequent analysis.
- Recovery phase: In case of dogs, a recovery phase of at least two weeks will be used in between different studies. Dogs will only be re-used in case the discomfort has not exceeded moderate.

Usually a single dose will be administered using varying routes and/or doses. Only in specific cases (where compound accumulation is a potential concern), repeated dosing for maximally one week may be necessary to reach maximal plasma levels. The route and frequency of administration will be detailed in the study plan. Treatment in fasted or fed animals is possible, depending on substance characteristics. Guinea pigs are more sensitive for diet restrictions and will not be fasted. All treatment specifications and justifications will be documented in the study plan and is subject to review of the Animal Welfare Body according to Wod art 10.1.3.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Pharmacokinetic screening in rodents
2	Pharmacokinetic screening in dogs

This project consists of 2 appendices as summarized below. A more detailed description is given in Appendices 1 and 2. In most cases rodents are the preferred species for first PK studies, but depending on the intended use of the compound, pharmacodynamics characteristics or metabolism of the compound, dogs might be needed instead of rodents. Occasionally, PK studies in rodents might be followed by PK studies in dogs for a selection of test substances.

- Appendix 1: Pharmacokinetic screening in rodents
- Appendix 2: Pharmacokinetic screening in dogs

Appendix 1 –Pharmacokinetic testing in rodents: Basic kinetic parameters determined in these studies will provide information on the availability of the Test Substance in blood / organs, half-life and potential for accumulation of the test substance in tissues and/or organs and the potential of biotransformation following exposure to the test substance. Kinetics will help to determine the optimal route and dose for further evaluation of the test substance and potential (unwanted) side effects. This will help the client in selecting the most promising candidate (whether or not a candidate should be developed further), selection of formulations, treatment regimens, dose levels and/or routes of administration.

Appendix 2 – Pharmacokinetic testing in dogs: Similar type and goal of studies as Appendix 1. Studies will be executed in dogs; depending on the intended use of the compound, pharmacodynamics characteristics, metabolism of the compound, or potential side effects, dogs can be the appropriate species to screen compounds for PK characteristics. This rationale for the use of dogs needs to be well-defined and documented.



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 Farmacokinetische screening van potentiële geneesmiddelen.
- 1.2 Looptijd van het project 5 Jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) Geneesmiddelen, screening,

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project. Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.* Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- 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 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen is een jarenlang proces en start met computermodellen gevolgd door meerdere type testen in het laboratorium. Om de werkzaamheid (en later ook de veiligheid) in mensen te kunnen vaststellen is het belangrijk te weten hoeveel van de toegediende stof in de bloedbaan komt, hoe lang na toediening het actieve product in de bloedbaan komt, hoe lang het in de bloedbaan blijft om afgeleverd te kunnen worden in organen en hoe lang het duurt voordat de stof wordt afgebroken. Het proefdier krijgt één dosis van het kandidaat middel waarna op ongeveer 6 tot 8 verschillende tijdstippen wat bloed wordt afgenomen. In het laboratorium wordt vervolgens bepaald hoeveel van het middel in het bloed terug is te vinden. Dit wordt farmacokinetisch (PK) onderzoek genoemd. Bedrijven ontwikkelen in deze research fase van het onderzoek vaak een aantal stoffen die op elkaar lijken om met de beste verder te kunnen gaan. Die keuze wordt dan gemaakt op basis van het PK onderzoek. Dit draagt bij aan een goede selectie van geneesmiddelen op basis van een verwachte

werkzame dosis. PK onderzoek wordt meestal gedaan in de rat of muis, maar in sommige gevallen kan de **cavia** of hond nodig zijn (afhankelijk van de stof eigenschappen en verwacht gebruik van de stof). **De cavia wordt bijvoorbeeld gebruikt in screening studies om kandidaat geneesmiddelen tegen hoestklachten te identificeren. De stoffen die het beste PK profiel vertonen worden in vervolgonderzoek (extern) ingezet in een diermodel dat de humane situatie reflecteert. De cavia wordt hiervoor gebruikt omdat dit het kleinste proefdier is dat een hoestreflex heeft (dit is niet aanwezig in muizen of ratten).**

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Dit project draagt bij aan de ontwikkeling van nieuwe humane geneesmiddelen. De organisatie heeft heel veel ervaring in het ontwerpen van de juiste dierproef met het minste aantal dieren en bezit ook de juiste apparatuur om de kandidaat medicijnen in bloed op te sporen. Deze apparatuur is kostbaar en er zijn ervaren mensen nodig om in het laboratorium de analyses uit te voeren, daarom besteden bedrijven dit uit aan zogenaamde Contract Laboratoria. Deze laboratoria kunnen de experimenten onder gestandaardiseerde omstandigheden uitvoeren.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Gebaseerd op de ervaring over de laatste vijf jaar en op een inschatting van (inter)nationale ontwikkelingen, worden voor de **lopende projectperiode** de volgende soorten en (maximale) aantallen per jaar verwacht:

Geschat maximaal aantal proefdieren over projectperiode	
Muis	1000
Rat	3000
Cavia	500
Hond	75

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

De dieren kunnen ongemak, stress of pijn ondervinden door toediening van het te testen middel. Dit kan enerzijds door de manier waarop het te testen middel wordt aangebracht bijvoorbeeld de injecties, en anderzijds door het afnemen van kleine hoeveelheden bloed.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Op grond van jarenlange ervaring met een veelheid van dierexperimenten wordt het ongerief ingeschat op 80% mild en 20% als matig.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Alle knaagdieren worden in het kader van de proef of na afloop van de proef geëuthanaseerd. De honden worden in principe hergebruikt mits het ongemak voor de dieren beperkt is gebleven.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Er is veel kennis om op basis van vooronderzoek met computermodellen, celkweek-methodieken en in vitro experimenten in te schatten wat de meest optimale route is om een nieuwe stof toe te dienen en het bloed voor verder onderzoek af te nemen. Maar het is nog niet mogelijk nieuwe geneesmiddelen te ontwikkelen zonder deze uiteindelijk te testen in proefdieren.

Het bedrijf is actief binnen het Nederlandse 3V-centrum (Vervanging, Vermindering, Verfijning), en het Europese Lab Animal Science (FELASA) netwerk. Het is daarom in een goede positie om de beste praktijken ter verbetering van het dierenwelzijn binnen contractonderzoek te stimuleren.

Het bedrijf is actief betrokken bij bedrijfstak-overkoepelende initiatieven, gericht op het delen van de beste praktijken en de toepassing van de 3 V's.

4.2 Vermindering

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

Doel is om de dierproef, met zo min mogelijk dieren, zodanig uit te voeren dat deze betrouwbare resultaten oplevert waardoor de producent verder kan met de ontwikkeling van het geneesmiddel. Het betreft hier screeningsonderzoek in een beperkt aantal dieren per stof.

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.

De gekozen diersoort is bij voorkeur de rat omdat daar meerdere bloedmonsters in 1 a 2 dagen kunnen worden afgenomen. In sommige gevallen kan de muis, **cavia** of hond nodig zijn (afhankelijk van de stof eigenschappen en verwacht gebruik van de stof). Om tot een goede diersoort keuze te komen worden gegevens uit eerder uitgevoerd onderzoek, bestaande productinformatie en gegevens uit de literatuur meegewogen.

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

De dierproeven worden, na interne goedkeuring door de Instantie voor Dierwelzijn (IvD), uitgevoerd volgens een vooraf vastgesteld protocol. Uitvoering vindt plaats door getrainde biotechnici. De dieren worden tijdens de duur van de studie minimaal twee dan wel meerdere keren per dag gemonitord. Alle dierhandelingen worden aan de hand van de door IvD en DEC goedgekeurde procedures uitgevoerd. De continue zorg voor het welzijn van de dieren door de ervaren onderzoekers tijdens de experimenten houdt de negatieve gevolgen zo beperkt mogelijk.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

5.1 lid2h
t.a.v. 5.1 lid2e
5.1 lid2h

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 5.1 lid2h 20173904-1

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 22 oktober 2019

Betreft Beslissing Aanvraag wijziging projectvergunning dierproeven

Geachte 5.1 lid2e

Op 24 juli 2019 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Pharmacokinetic screening of pharmaceuticals" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 20173904, waarvoor op 14 december 2017 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 20173904-1. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u 500 cavia's toe te voegen aan de vergunning. Wij hebben uw wijzigingsaanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project "Pharmacokinetic screening of pharmaceuticals" uit te voeren. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie 5.1 lid2h (hierna: de DEC). Dit advies is opgesteld op 11 oktober 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC. Wij nemen dit advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Overwegingen

Op grond van de bovenstaande stukken zijn wij van mening dat de toe voegen dierproeven toelaatbare wijzigingen betreffen van het project, waarvoor op 14 december 2017 een vergunning is verleend.

Datum
22 oktober 2019

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 5.1 lid 2h 0173904-1

Vergunning

Aan uw vergunning worden de volgende dierproeven toegevoegd:

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1: Pharmacokinetische screening in rodents	Cavia's (Cavia porcellus)	500	20% Matig 80% Licht

Voor het overige blijft de vergunning ongewijzigd.
U dient deze brief toe te voegen bij uw oorspronkelijke vergunning.

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 gegevens in het colofon.

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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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 aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

5.1 lid 2h

Drs. F. Braunstahl

Bijlagen
- DEC-advies



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
- 1.2 Looptijd van het project
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5)

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- Fundamenteel onderzoek
- Translatieel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- 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
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*

3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen is een jarenlang proces en start met computermodellen gevolgd door meerdere type testen in het laboratorium. Om de werkzaamheid (en later ook de veiligheid) in mensen te kunnen vaststellen is het belangrijk te weten hoeveel van de toegediende stof in de bloedbaan komt, hoe lang na toediening het actieve product in de bloedbaan komt, hoe lang het in de bloedbaan blijft om afgeleverd te kunnen worden in organen en hoe lang het duurt voordat de stof wordt afgebroken. Het proefdier krijgt één dosis van het kandidaat middel waarna op ongeveer 6 tot 8 verschillende tijdstippen wat bloed wordt afgenomen. In het laboratorium wordt vervolgens bepaald hoeveel van het middel in het bloed terug is te vinden. Dit wordt farmacokinetisch (PK) onderzoek genoemd. Bedrijven ontwikkelen in deze research fase van het onderzoek vaak een aantal stoffen die op elkaar lijken om met de beste verder te kunnen gaan. Die keuze wordt dan gemaakt op basis van het PK onderzoek. Dit draagt bij aan een goede selectie van geneesmiddelen op basis van een verwachte

werkzame dosis. PK onderzoek wordt meestal gedaan in de rat of muis, maar in sommige gevallen kan de **cavia** of hond nodig zijn (afhankelijk van de stof eigenschappen en verwacht gebruik van de stof). **De cavia wordt bijvoorbeeld gebruikt in screening studies om kandidaat geneesmiddelen tegen hoestklachten te identificeren. De stoffen die het beste PK profiel vertonen worden in vervolgonderzoek (extern) ingezet in een diermodel dat de humane situatie reflecteert. De cavia wordt hiervoor gebruikt omdat dit het kleinste proefdier is dat een hoestreflex heeft (dit is niet aanwezig in muizen of ratten).**

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Dit project draagt bij aan de ontwikkeling van nieuwe humane geneesmiddelen. De organisatie heeft heel veel ervaring in het ontwerpen van de juiste dierproef met het minste aantal dieren en bezit ook de juiste apparatuur om de kandidaat medicijnen in bloed op te sporen. Deze apparatuur is kostbaar en er zijn ervaren mensen nodig om in het laboratorium de analyses uit te voeren, daarom besteden bedrijven dit uit aan zogenaamde Contract Laboratoria. Deze laboratoria kunnen de experimenten onder gestandaardiseerde omstandigheden uitvoeren.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Gebaseerd op de ervaring over de laatste vijf jaar en op een inschatting van (inter)nationale ontwikkelingen, worden voor de **lopende projectperiode** de volgende soorten en (maximale) aantallen per jaar verwacht:

Geschat maximaal aantal proefdieren over projectperiode	
Muis	1000
Rat	3000
Cavia	500
Hond	75

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

De dieren kunnen ongemak, stress of pijn ondervinden door toediening van het te testen middel. Dit kan enerzijds door de manier waarop het te testen middel wordt aangebracht bijvoorbeeld de injecties, en anderzijds door het afnemen van kleine hoeveelheden bloed.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Op grond van jarenlange ervaring met een veelheid van dierexperimenten wordt het ongerief ingeschat op 80% mild en 20% als matig.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Alle knaagdieren worden in het kader van de proef of na afloop van de proef geëuthanaseerd. De honden worden in principe hergebruikt mits het ongemak voor de dieren beperkt is gebleven.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Er is veel kennis om op basis van vooronderzoek met computermodellen, celkweek-methodieken en in vitro experimenten in te schatten wat de meest optimale route is om een nieuwe stof toe te dienen en het bloed voor verder onderzoek af te nemen. Maar het is nog niet mogelijk nieuwe geneesmiddelen te ontwikkelen zonder deze uiteindelijk te testen in proefdieren.

Het bedrijf is actief binnen het Nederlandse 3V-centrum (**V**ervanging, **V**ermindering, **V**erfijning), en het Europese Lab Animal Science (FELASA) netwerk. Het is daarom in een goede positie om de beste praktijken ter verbetering van het dierenwelzijn binnen contractonderzoek te stimuleren.

Het bedrijf is actief betrokken bij bedrijfstak-overkoepelende initiatieven, gericht op het delen van de beste praktijken en de toepassing van de 3 V's.

4.2 Vermindering

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

Doel is om de dierproef, met zo min mogelijk dieren, zodanig uit te voeren dat deze betrouwbare resultaten oplevert waardoor de producent verder kan met de ontwikkeling van het geneesmiddel. Het betreft hier screeningsonderzoek in een beperkt aantal dieren per stof.

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.

De gekozen diersoort is bij voorkeur de rat omdat daar meerdere bloedmonsters in 1 a 2 dagen kunnen worden afgenomen. In sommige gevallen kan de muis, **cavia** of hond nodig zijn (afhankelijk van de stof eigenschappen en verwacht gebruik van de stof). Om tot een goede diersoort keuze te komen worden gegevens uit eerder uitgevoerd onderzoek, bestaande productinformatie en gegevens uit de literatuur meegewogen.

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

De dierproeven worden, na interne goedkeuring door de Instantie voor Dierwelzijn (IvD), uitgevoerd volgens een vooraf vastgesteld protocol. Uitvoering vindt plaats door getrainde biotechnici. De dieren worden tijdens de duur van de studie minimaal twee dan wel meerdere keren per dag gemonitord. Alle dierhandelingen worden aan de hand van de door IvD en DEC goedgekeurde procedures uitgevoerd. De continue zorg voor het welzijn van de dieren door de ervaren onderzoekers tijdens de experimenten houdt de negatieve gevolgen zo beperkt mogelijk.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

Dit betreft een wijziging. Wijzigingen t.o.v. oorspronkelijke aanvraag zijn in rood aangegeven.