

	Inventaris Wob-verzoek W21-04 202011789								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Opschortbrief, d.d. 25 januari 2021				x		x	x	
2	Project Proposal, d.d. 15 februari 2021				x		x	x	
3	Appendix Animal Procedures, d.d. 15 februari 2021				x			x	
4	DEC-Advies, d.d. 19 februari 2021				x		x	x	
5	Brief van VGH inzake antwoord op vragen CCD, d.d. 8 maart 2021				x		x	x	
6	Brief van VGH inzake antwoord op vragen CCD, d.d. 15 maart 2021				x		x	x	
7	Interne Adviesnota, d.d. 22 maart 2021				x		x	x	x
8	Beschikingsbrief, d.d. 23 maart 2021				x		x	x	
9	NTS	x							



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag -

10.2.e en 10.2.g

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVC 10.2.g 202011789

Datum 25 januari 2021
Betreft Vervolg aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Complexe aanvraag

Tijdens de beoordeling van uw aanvraag blijkt dit project dermate complex te zijn dat meer tijd nodig is om de aanvraag volledig te beoordelen. Als wij nog informatie nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. U krijgt binnen vijftien werkdagen nadat uw aanvraag compleet is, een beslissing op uw aanvraag. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

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'.

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

1.3 Provide the title of the project.

10.2.g

Define optimal injection strategy of an antisense oligonucleotide (ASO) for Angelman Syndrome

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

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.

Angelman Syndrome (AS) is a rare genetic neurodevelopmental disorder (approximately 1 in 15,000 people), characterized by developmental delay, small head and brain, severe speech impairment and

sleeping disorders. The delayed development only becomes apparent at around 6-12 months of age. A large number of patients have seizures and/or develop scoliosis. Most children have a happy excitable personality with frequent smiling and hand flapping movements. The sleeping disorders and hyperexcitability can improve with age, but AS patients need lifelong 24h care. The life expectancy appears to be normal, or maybe slightly reduced (max reduction of 10 years) (Margolis et al., 2015). AS is caused by a defect in the maternal copy of the gene ubiquitin protein ligase E3A (UBE3A). UBE3A normally exhibits many functions besides ubiquitin transfer, like helping to degrade misfolded proteins, regulation of the circadian clock, coactivator in transcriptional activation of the progesterone receptor and, importantly, regulation of synaptic development and function. Mouse studies have shown that specifically in the brain, the paternal copy of the gene is silenced in neurons by a non-coding antisense transcript (Ube3-ATS) while it is biallelically expressed in other tissues. This brain-specific imprinting of UBE3A is presumably found in humans as well. The majority of human AS cases (70-80%) is caused by deletion of a part of the maternal chromosome 15 (15q11-q13); these patients show the most severe phenotype. Other molecular mechanisms include intragenic mutations, paternal uniparental disomy (2 copies of the paternal gene, none from the mother) or imprinting defects within chromosome 15q11-13 that alter the expression of the maternal copy of the gene (Margolis et al., 2015).

There is no specific therapy available to treat these patients, although some of the symptoms of the disease can be treated. Often AS patients are treated with anti-epileptics to reduce the seizures, and some are on limited sleep medication and/or on Ritalin. A more targeted treatment aiming to restore the lost expression of the paternal UBE3A gene and as a consequence of that hopefully restoring the cognitive capacity, could potentially be a life-changer for these people and their care-takers. This is the final goal of this entire research project.

Possible treatments

Histone deacetylases (HDAC) 1 and 2 were overexpressed in AS-mice, already during embryonic development (Jamal et al., 2017). HDACs regulate expression of many genes through chromatin remodeling, so the impact of overexpression of these two genes on the development of the brain may be huge, and therefore normalization of the expression levels may have a positive impact on the functionality of the brains of AS patients. A potential treatment to normalize HDAC1/2 expression levels would be possible by using Simvastatin, an HMG CoA (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA) reductase enzyme repressor, commonly used as cholesterol-lowering drug. This blood-brain barrier passing drug, is known to inhibit expression of HDAC1 and 2, apart from its cholesterol-reducing activity (Lin et al., 2008). Treatment of AS mice with Simvastatin reduced the HDAC1/2 levels, increased the brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression and significantly improved the cognitive functions of the mice (Kumar et al., 2019).

Another therapeutic approach is the induction of reactivation of the paternal copy of the UBE3A gene in the brain, this can be achieved by an oligonucleotide targeting the inactivating antisense ribonucleic acid (RNA). In this way it prevents the interaction between the antisense RNA and the intact paternal copy of the gene, thereby reverting the expression of the UBE3A gene. Mild amelioration of the memory impairment was observed in AS mice upon treatment with an oligonucleotide targeting the antisense UBE3A RNA (Meng et al., 2013), even when treated during adulthood. These are very promising results, but translation from mouse to man is particularly difficult for neurodevelopmental disorders (Ottenhof et al., 2020) and this requires further research.

Drug delivery to the brain is challenging due to the blood-brain barrier (BBB). By injecting directly into the cerebrospinal fluid (CSF), distribution to the ependymal surface of the brain is at least ensured but further distribution into the deeper parenchyma is unknown though essential for a successful treatment. Convective forces generated in the CSF by the intrathecal (IT) injection itself can increase the spread of the drug in the brain. Other convective forces which can have an effect on the distribution are CSF turnover, cardiac motion, respiratory thoracic motion and body movement.

Very few clinical trials in AS patients have been performed. Up to now (September 2020) 5 different drugs have been tested in clinical trials: Betaine/folic acid gave no improvement and the results of other four

drug treatments: levodopa, minocycline, OV-101 (gamma-aminobutyric acid (GABA) agonist) and GTX-102 (antisense oligo) have not been made publicly available, so far.

The project proposed here is specifically designed as a tool to develop protocols for antisense oligonucleotide (ASO) administration in the brain which could, in the end, restore the function of the impaired UBE3A gene.

10.2.g is a 10.2.g ASO that reactivates expression of UBE3A protein in neurons of AS patients (unpublished data).

10.2.g was identified by an *in-vitro* locked nucleic acid (LNA) screening platform using human induced pluripotent stem cell (hiPSC) neurons derived from AS subjects. 10.2.g produced a dose dependent reduction of the UBE3A antisense (UBE3A-ATS) with median IC50 (inhibitor concentration that reduces the response by half) of 7 nM and a dose dependent increase in the UBE3A sense with median EC50 (drug concentration that gives half-maximal response) of 35 nM following a 5-day incubation period.

10.2.g showed consistent dose-dependent reductions of UBE3A-ATS RNA and dose-dependent increases in UBE3A sense RNA and UBE3A protein in iPSC neurons derived from both diseased and non-diseased human neurons, as well as cynomolgus wildtype (WT) neurons.

The *in vitro* results confirm that the concept of ASO-mediated Ube3a-ATS targeting to upregulate Ube3a mRNA and UBE3A protein, as previously shown in mice (Meng et al., 2015), is translatable to human and cynomolgus neurons in a disease and non-disease context. This enabled further assessment of pharmacodynamic (PD) properties of 10.2.g *in-vivo* in nonhuman primates.

10.2.g PD was studied in two cynomolgus macaque studies following intrathecal (IT) injections, the intended clinical administration route. Pharmacodynamic responses were measured in various regions of the brain by analysing: 1) UBE3A-ATS RNA, 2) UBE3A sense mRNA and 3) UBE3A protein.

In normal macaques, UBE3A is expressed from the maternal allele. Once the UBE3A paternal allele is unsilenced, UBE3A mRNA is expected to be expressed from both alleles and protein expression should increase up to 200% upon treatment, enabling PD analysis in non-diseased macaques.

Single- (and repeat-) Dose PK/PD Study in Macaques

10.2.g was administered once or twice by IT injection to cynomolgus macaques. A single dose of 24 mg 10.2.g in macaques resulted in long-lasting pharmacodynamic effects in several brain regions. Those effects were UBE3A-ATS reduction, UBE3A-sense mRNA and UBE3A protein induction and were sustained over at least 85 days (end of study), compared to vehicle-treated macaques.

Best PD effects were observed in cortex regions (target tissues), hippocampus and cerebellum, while the PD effects were lower in midbrain, medulla and pons due to lower tissue LNA uptake.

An 8-week toxicity study was conducted in male and female cynomolgus macaques with a recovery period of 8 weeks. 10.2.g was administered IT at 4, 14, or 30 mg/animal doses once every 4 weeks (on Days 1, 29, and 57 for a total of 3 doses).

Repeated dosing of 10.2.g in macaques resulted in dose-dependent reduction in UBE3A-ATS, as well as dose-dependent increases in UBE3A-sense transcript and UBE3A protein at Week 9 (Day 64). In the 30-mg dose group the median cortical level of UBE3A-ATS was 95% lower, UBE3A-sense transcript 209% higher and UBE3A protein 179% higher, compared to vehicle-treated macaques. At Week 17 (Day 120), reduction in UBE3A-ATS as well as elevations in UBE3A-sense and UBE3A protein levels were still measurable in the 14- and 30-mg dose groups. Strongest effects were observed in cortical regions for all three PD parameters as well as in spinal cord for UBE3A-ATS, hippocampus for UBE3-sense and dorsal striatum and hippocampus for UBE3A protein. From these studies it became clear that the IT administration procedures can be quite complex and volumes of administration and flushing volumes can impact distribution of the compound into the brain. Administration of test compound in 1 ml followed by a 0.25 ml flushing volume resulted in a much lower concentration in the brain compared to flushing with 1.5 ml after

administration of the test compound in 1 ml. In conclusion, these experiments suggest that increasing the flushing volume leads to a higher concentration of the drug in the brain which is confirmed by *ex vivo* analysis. However, it also became clear that, although the concentration of the drug in the entire brain was increased. The distribution over the different brain regions was heterogenous were a homogenous distribution is desired.

Clinical trials with 10.2.g

Two clinical trials will start this year using an antisense oligonucleotide in patients. The goal of both clinical trials is testing the safety, tolerability and impact of the drug on the homeostasis of the body (e.g. body temperature, blood pressure and heartrate). 10.2.g

In healthy volunteers a limited number of parameters can be determined and it is not possible to optimize the drug injection method in humans. Furthermore, the CSF volume and the anatomy of the brain differ in AS patients from healthy persons. Which means that for translation of the data from the healthy volunteers to patients, more details are mandatory. To be able to translate the results to the clinic a species with comparable brain anatomy should be used (Hocking et al. (2004), Sullivan et al. (2020)).

Multiple large animal species could be used, like the cat, sheep, dog and pig, for this goal, which model to choose is dependent on multiple factors but mainly based on two points. The most important factor is already mentioned above, comparable brain anatomy. When comparing the relation of the cerebrum with the cerebellum of humans with multiple large animal models this is clearly different for the cat, the sheep and the pig (Sorby-Adams et al., 2018). The other point is the anatomy of the spinal cord and the possibilities of an intrathecal injection. In human and macaques this is a simple procedure as the spinal canal ends around the upper lumbar vertebrae. In other mammals this canal, and with this the CSF, is often longer making the puncture more difficult (Pleticha et al., 2013, Hinderer et al., 2020). This makes the macaque the most optimal model also because the previous experiments are performed with the macaque. Choosing for another animal model means that the previous experiments have to repeated before continuing with the experiments described in this protocol.

Optimisation of drug injection method.

in NHP studies multiple injection methods can be tested in combination with sampling of CSF and blood. These data can be combined with PET-CT analysis to determine the distribution of the drug longitudinally and *in vivo*. In the previous study in NHP the concentration had to be determined by collecting brain samples. As this information is currently available the concentration in this study can be derived from the signal intensity found on the PET-CT in combination with blood and CSF samples. Collection of brain samples is for this reason no longer needed. This allows the testing of several injection procedures, partly in the same animal, without the need to sacrifice the animals.

The study in healthy volunteers is necessary for the translation towards the study in AS patients. The study in NHP is needed to optimize the injection technique in order to obtain the highest concentration of the 10.2.g in the entire brain. Both sets of information are needed to be able to make the most optimal choice for the clinical trials in AS patients. Testing multiple injection methods in combination with sampling of CSF is not possible in patients. As one on the test conditions evaluated in the NHP will be kept similar to the single test condition used in humans, a direct comparison can be made, allowing for extrapolation of the generated NHP data. Based on the blood and CSF measurements similarity between the macaques and humans can be determined. In addition, with this data a bio-mathematical kinetic model can be generated to derive estimates of the concentration of labelled compound in the brain achieved in combination with the PET signals, PET signals derived from the entire brain of macaques can be coupled to the signal intensity found in human. In this way the actual concentration of 10.2.g can be determined in the human brain

To summarize; the study in healthy volunteers will repeat one of the injection methods used in macaques. In healthy volunteers, similar to macaques, a PET will be obtained and blood and CSF will be collected. By this the macaque and healthy volunteer data can be compared to each other creating a link between the PET signal and the concentration in blood/CSF in healthy volunteers. With this link the concentration of the drug in different parts of the human brain could be determined. Thus, the study in macaques give the optimal injection method and the study in healthy volunteers shows which drug concentration could be reached in humans. Both will be applied for the translation to the patient.

Literature:

- Margolis et al.; Angelman Syndrome. Neurotherapeutics. (2015)
- Greer et al.; The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. (2010)
- Jamal et al.; Rescue of altered HDAC activity recovers behavioural abnormalities in a mouse model of Angelman syndrome. Neurobiol. Dis. (2017)
- Berg et al.; Translational outcomes in a full gene deletion of ubiquitin protein ligase E3A rat model of Angelman syndrome. Transl Psychiatry.(2020)
- Lin et al.; Statins increase p21 through inhibition of histone deacetylase activity and release of promoter-associated HDAC1/2. Cancer Res. (2008)
- Kumar et al.; Simvastatin Restores HDAC1/2 Activity and Improves Behavioral Deficits in Angelman Syndrome Model Mouse. Front Mol Neurosci. (2019)
- Ottenhof et al.; Considerations for Clinical Therapeutic Development of Statins for Neurodevelopmental Disorders. eNeuro. (2020)
- Meng et al.; Truncation of Ube3a-ATS unsilences paternal Ube3a and ameliorates behavioral defects in the Angelman syndrome mouse model. PLoS Genet. (2013)
- Meng et al., Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA. Nature. (2015)
- Hocking et al.; Intrathecal drug spread. BJA. (2004)
- Sullivan et al.; Convective forces increase rostral delivery of intrathecal radiotracers and antisense oligonucleotides in the cynomolgus monkey nervous system. J Transl Med. (2020)
- Sorby-Adams et al.; Large animal models of stroke and traumatic brain injury as translational tools. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. (2018)
- Pleticha et al. Pig lumbar spine anatomy and imaging-guided lateral lumbar puncture: a new large animal model for intrathecal drug delivery. J Neurosci Methods. (2013)
- Hinderer et al. Translational Feasibility of Lumbar Puncture for Intrathecal AAV Administration. Mol Ther Methods Clin Dev. (2020)

3.2 Purpose

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

- If the project is focussed 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 main objectives of this project are: to determine in NHP which IT injection technique results in the highest concentration for 10.2.g in the brain; to establish the biodistribution of 10.2.g ; and to compare the PET-CT signal in NHPs to PET-CT signals in healthy volunteers.

The goal is to determine which IT administration method leads to the highest concentration of 10.2.g in the brain. For this ASOs will be IT injected in cynomolgus macaques, followed by CSF and blood sampling and PET-CT. One of those administration methods will later on be used in the healthy volunteer study. The ultimate goal is to generate a safe, effective and tolerable treatment for AS patients.

Feasibility of the project:

For various reasons we believe that our research objectives can be achieved:

1. The rationale and objective is supported by a relevant body of (recent) literature and (ongoing) *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* experiments, and we have ample experience with the proposed research strategies (Rotaru et al., *Neuroscience*, 2020, Feb 21:S0306-4522(20)30103-2).
2. The high quality of our work is confirmed by the publications in leading international scientific journals (e.g. Dijkman et al., *Nature Medicine* (2019), van der Aart et al., *Mol Imaging Biol* (2019), Sterck et al., *Am J Primatol* (2019).).
3. We have an excellent work environment with experienced persons, state-of-the-art techniques (e.g. PET-CT) and animal models; and actively collaborate with world leading experts in academia and industry (e.g. Dijkman et al., *Nature Medicine* (2019), 10.2.e

3.3 Relevance

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

Social. Angelman Syndrome is a debilitating neurodevelopmental disorder in which intellectual functions, social communication, cognition and behaviour are separately impaired which has a substantial impact on the quality of life of patients with e.g. sleep problems, seizures, gastrointestinal problems and disruptive/aggressive behaviours. At present, there is no specific treatment only supportive treatment available for AS which consists only of suppression of the symptoms. With this new approach, a more targeted treatment will be developed, which could result in alleviation of the physical problems, improving the mental skills and quality of life of these people.

Scientific. While the distribution of a compound is dependent on its specific chemical characteristics the results obtained in this study will give more information about the interaction between the pressure and amount of fluid in the IT space, in combination with the convective forces on the distribution of compounds in the brain. The results generated will be published to optimize IT injections for humans in the future.

In this project, we will analyse the compound distribution in healthy macaque brains using different application methods (determine optimal flushing volume resulting in highest drug concentration in the brain and testing whether replacement of macaque CSF has impact on the tissue distribution of the compound). The results from this experiment will be used to design a protocol for optimal administration of this compound in humans, resulting in pharmacological brain exposure and best benefit risk ratio. The risk is that the dose is too low and the patient will not benefit enough from the treatment. The risk of dosing to high is low and unlikely as we are covered by the NHP toxicity studies already performed with doses which were at least 5 times higher than planned in this study. This enhances the chance of a positive outcome for the clinical trials with AS patients.

3.4 Research strategy

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

The overall strategy is to develop an optimized injection method suitable for application of ASO 10.2.g in NHPs and ultimately in Angelman Syndrome patients. To achieve this both experiments in macaques and healthy volunteers are mandatory. For this, macaque experiments are necessary as the brain anatomy and physiology resembles the human brain best. Macaques will be injected with labeled and unlabeled ASOs, using different methods to determine which procedure is needed to obtain the highest and most homogenous tissue distribution. The dosing of the drug (dose and injection volume) is the standard amount for ASOs in NHPs, the amount of flushing volume (amount of fluid injected after injection of the drug) which will be tested is partly based on previous results. To clarify, the injection consists of two parts; the injection of the drug and the flushing afterwards. The injection of the drug is standardized with 4 mg ASO dissolved in 1 ml fluid, the flushing volume will be varied. The rationale for this variation is based on the result that a 10-fold increase in concentration of the drug was found in the brain after a minor increase in flushing volume. However, it is unknown if a further increase in flushing volume would lead to an even higher concentration of the drug in the brain and whether this increase stays present over time or that this effect is only found in the early time points after injection.

For a PET-CT, the specific concentration necessary for imaging is in the pmol range while for a pharmacological exposure this will be a couple of magnitudes higher, with a dose of 10.2 g of a couple of mg. To compensate for this difference and to obtain a realistic distribution of the compound the standard procedure is to add 'cold' compound. Imaging is possible by the emission of positrons of a radionuclide. A couple of radionuclides are in clinical use for this purpose of which C-11, F-18 and Zr-89 are the most commonly used. The main difference between those 3 is their half-life varying from only 20 minutes up to 3 days. Which one to use is dependent on the compound, the goal and research question. Compounds which are cleared fast or of which the target is changing rapidly over time a radionuclide with a shorter half-life is preferred. In this project, we would like to follow the compound over time by which we need to use a radionuclide with a longer half-life like Zr-89.

In the both macaque experimental phases the drug will always be injected in the same amount of fluid, but the flushing volume will vary. The intention is to obtain a high and homogenous distribution of the drug over the brain, but this procedure might also result in an accumulation in the ventricles or subarachnoid space. Furthermore, the accompanying increase in pressure may have undesired side-effects. In the second phase of the study three different dosing strategies will be used; one withdrawing the same amount of CSF which is injected, one in which less CSF is withdrawn and one in which more CSF is withdrawn than injected. The results will indicate either whether less pressure will suffice or instead more pressure is needed to achieve a high and homogenous distribution. This second part is using the same macaques that have been used in the first part after the Zr-89 is decayed (half-life is 78.4h, around 10 half-life's are used which is approximately 30 days). PET-CT, blood and CSF measurements will be performed to determine the effect of the procedure on the distribution of the ASO. PET-CT, fused with a previous obtained MRI, will be used to determine the uptake pattern and measurements in cerebrospinal fluid (CSF) and blood to monitor the compound distribution in the brain at several timepoints post injection.

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.

Macaques will be injected with an oligonucleotide targeting the antisense UBE3A transcript that inactivates the paternal copy of the gene. Before injection of the compound, information is needed about the anatomy of the brain and the volume of CSF for each individual animal. Therefore, the experiment will start by performing an MRI of the brain of all macaques. MRIs will be performed on a different site/facility. In this way the soft tissue anatomy of the brain of each macaque is known and can be used for fusion with the PET-CT to combine functional imaging with anatomical imaging. In addition, the MRI is important to be able to determine the volume of CSF, which differs between both humans (140-270 ml) and macaques (9-15 ml). Animals will be distributed over the groups in such a way that the variation in CSF volume is comparable between the groups. However, those values will not be used to adjust the injection volumes. After recovery from the transport to the MRI in their home cage, macaques will be IT injected; by lumbar puncture when placed in left lateral recumbence, in the treatment room of 10.2 g. This IT injection method is comparable to humans in which the person is sitting or lying on his side with the back bended. In all cases placement of the needle will be verified by the presence of CSF at the needle hub. They will be injected with unlabeled ASO and hot ⁸⁹Zr-labeled compound 10.2 g. Combining unlabeled ASO with labeled compound is the standard procedure to increase the specific concentration of the compound. It is unknown whether labeling with Zr-89 will influence the pharmacokinetics of the compound but labeling with Zr-89 is done with other drugs without any impact on the biodistribution.

PET-CT will be performed at regular time points after injection, and blood and CSF samples will be collected to compare distribution of parent compound and radio-labeled compound. Compound concentrations in blood and CSF will be determined at the same timepoints as when a PET-CT is performed. A total of 6 PET-CTs are initially planned for each study period. Nevertheless, as the qualitative results of the scans are available within 24h after the scan adaptations on this schedule can be made based on the findings. When the tracer is almost completely cleared by the body after the fourth scan the added value of the last two scans is minimal. On the other hand, when still alterations in the distribution of the tracer are detected after 6 scans we might want to add additional timepoints to determine the entire PK-PD curve. Leading to a maximum of 5 scans and blood/CSF samples in one week and a maximum of 8 scans and blood/CSF samples in each study period.

For the two experiment the same macaques will be used as the results of both study periods will be used sequentially, as in this way no second MRI is necessary and the variation stays the same. The results of the PK/PD of the first study can be used to determine the injection technique for the second study period, the technique reaching the highest dose in the brain will be used for this. The discomfort of each experimental phase is considered moderate but the total experienced discomfort of the experiments will not exceed this level. Between the two experiments a wash-out period of 4 weeks will be taken into account.

The first experiment will be performed using a single dose of compound comparing different flushing volumes (different amount of fluid will be injected after injection of the compound), or using a high volume without flushing, to determine the optimal flushing volume. In the second experiment we test the influence of CSF withdrawal on drug distribution. We compare distribution with or without CSF withdrawal or using no withdrawal and a high volume.

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.

In the first part of the study the optimal flushing volume is determined, in the second part of the study (that will be performed in the same macaques), the impact of CSF withdrawal before drug administration method is investigated.

The second part of the experiments will show if similar results can be obtained without an increase in brain pressure. This makes this part highly valuable for the patient. So, it is necessary to perform the second phase of the experiments not directly for optimizing the dose in the brain but for the well-being of the patient. For this a go/no-go is incorporated between the two phases, to secure the well-being of the macaque; based on the results of the first phase and the possible side-effects we will discuss, with the IvD, the volumes to be used in the second phase.

The milestones for this project are:

- 1) obtain optimal flushing volume to induce the best (highest and homogenous) tissue distribution
- 2) obtain information whether it is necessary to withdraw macaque CSF
- 3) generate a protocol suitable for NHP and human application
- 4) generate a bio-mathematical kinetic model to derive estimates of the concentration of the labelled compound in the brain

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	Determining the optimal IT injection for 10.2.g in a healthy cynomolgus macaque model.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

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'.

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

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

10.2.g

Serial number	Type of animal procedure
1	Determining the optimal IT injection for 10.2.g in a healthy cynomolgus macaque model.

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.

In this project, we focus on the reactivation of the parental copy of UBE3A. The goal is to determine which intrathecal (IT) administration needs to be used which results in the highest drug concentration in the brain and is feasible to use in humans.

The primary outcome parameter for determining the optimal IT administration is the concentration of the test compound in the brain. The higher the concentration and homogenous the distribution the better. We will determine this concentration systemically by obtaining blood and CSF at multiple timepoints after injection, predominantly in the first week. At the same timepoints a PET-CT will be obtained to determine the uptake and distribution of the test compound in the brain.

As every compound has a its own behavior *in vivo*, due to its chemical characteristics, we cannot rely on other compounds and only take their injection method as starting point. In this experiment, we will inject macaques with an oligonucleotide targeting the antisense UBE3A transcript that inactivates the paternal copy of the gene. For reactivation of UBE3A, expression of the paternal allele is necessary. To achieve this, we need to get rid of the antisense transcript that inactivates the paternal allele.

Before injection of the compound, information is needed about the soft tissue anatomy of the brain and the volume of cerebrospinal fluid (CSF) for each individual animal. This will be obtained via an MRI, performed

at a different facility/site. For this the animals will be transported awake in a dedicated transport vehicle. The animals will be trained to voluntarily enter the transport box to reduce the amount of discomfort as much as possible. The MRI will be obtained under general anesthesia and will not exceed the 2hr. After waking up, the animal will be transported back to 10.2.g

MRI is an imaging technique to visualize soft tissue with high detail, as the anatomy of every macaque (and human) slightly differs it is essential to determine this for each animal specifically to be able to relate the distribution of the compound in the brain. Next to the anatomical variation there is, independent of age and size also variation in the amount of CSF volume between macaques (9-15 ml) and humans (140-270 ml). As we perform an IT injection we need to determine this amount on forehand to use as selection criteria for the different treatment groups. In such a way, that the variation in CSF volume is comparable between the groups. Otherwise it might be possible that the results obtained are related to the amount of CSF present. Based on the pre-determined amount of CSF, the total amount of drug in the CSF could be calculated. For this it is not necessary to adapt the amount of injected dose of ASO on forehand also because this will alter the relation between the injection of the drug and the flushing volume creating an additional variable. These considerations are true for both phases and animals will not be redistributed between the groups.

After the MRI (and a recovery period in the home cage), the macaque will be injected, at the Institutes' facilities, with unlabeled ASO and ⁸⁹Zr-labeled compound 10.2.g. A PET-CT will be performed on site at regular time points after injection and blood and CSF samples will be collected to compare distribution of parent compound and radio-labeled compound. Compound concentrations in blood and CSF will be determined at the same timepoints as when a PET-CT is performed. The details about the timing of those procedures are described at the end of this section.

With the PET-CT the distribution of the drug over time could be followed in a minimal invasive way besides the more general information obtained from the blood and CSF in a PK/PD study. By using PET-CT we will be able to measure how much the change in flushing volume will affect the transfer and distribution of the dose through the body and especially the brain. In addition, the image data could confirm the IT injection to be single-compartmental in the IT space and not multi-compartmental or only partially in the IT space. Even if the veterinarian assesses the injection to be successful, this is possible to happen due to small movements of both the animal or veterinarian while injecting as the injection space is small and the injection time relatively long. With a PET-CT you would be able to visualize an increased signal intensity around the injection spot. By this we would know that all of the compound is injected correctly, which makes the outcomes of the study more reliable.

Both blood and CSF, similar to the clinical trial in patients and study in healthy volunteers, will be obtained for the PK/PD of the drug as the drug is injected in the CSF and it is known that this will be distributed to both the brain and the blood. Which percentage will enter the bloodstream could be influenced by the convective forces of the injection. By obtaining both a full spectrum of information is secured. In addition, both blood and CSF are necessary to generate a bio-mathematical kinetic model to derive estimates of the concentration of labelled compound in the brain achieved in combination with the PET signals. The generation of such a model is necessary to make the translation from NHP to human.

In this project we will have two experimental periods with a washout period of 4 weeks. The first experiment is to determine the optimal flushing volume, volume of fluid injected after the drug is injected, by using a single dose of compound with different flushing volumes. In the second phase of the study three different dosing strategies will be used; one withdrawing the same amount of CSF which is injected, one in which less CSF is withdrawn and one in which more CSF is withdrawn than injected. The results will indicate either whether less pressure will suffice or instead more pressure is needed to achieve a high and homogenous distribution.

Between the two phases a go/no-go is incorporated. In the second phase we will determine if similar results can be obtained without an increase in brain pressure. This makes this part highly valuable for the patient. So, it is necessary to perform the second phase of the experiments not directly for optimizing the dose in the brain but for the well-being of the patient. Nevertheless, the go/no-go is incorporated for the well-being of the macaques. Based on the results of the first phase and the possible side-effects we will discuss, with the IvD, the volumes to be used in the second phase.

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

The test compound will be given once at the start of each study period via an IT injection in the distal lumbar spine via the standard procedure as described in Turner et al., (2013). By performing the procedure in this way no additional analgesia is necessary as the used anesthetics will provide sufficient analgesia post-procedure for the time discomfort is expected. The injected drug will be delivered at body temperature. A digital temperature-controlled heating bath will be used to deliver it at the right temperature.

Blood and CSF are taken at multiple time points on the day of injection and subsequently at regular time intervals for PK/PD analysis primarily in the first week after injection of the test compound. In general, blood volumes will not exceed a maximum of 1% of the body weight per 4 weeks (and 0.7% max per bleeding, anticipated is a volume of 0.5 ml). A CSF volume of 0.2 ml will be sampled which is in general physiologically safe (only a couple of percent from the total, assuming a minimal CSF volume of 9 ml and the average turnover time of CSF is 0.4 ml/min (Sullivan et al. (2020)). At those same timepoints a PET-CT will be obtained to follow, in a minimal-invasive way, the distribution of the test compound over time. During the PET-CT, physiological parameters of the macaques will be closely monitored e.g heartbeat, respiratory frequency, saturation (SpO₂%) and rectal body temperature. A total of 6 PET-CTs are initially planned for each study period. Nevertheless, as the qualitative results of the scans are available within 24h after the scan adaptations on this schedule can be made based on the findings. When the tracer is almost completely cleared by the body after the fourth scan the added value of the last two scans is minimal. On the other hand, when still alterations in the distribution of the tracer are detected after 6 scans we might want to add additional timepoints to determine the entire PK-PD curve. Leading to a maximum of 5 scans and blood/CSF samples in one week and a maximum of 8 scans and blood/CSF samples in each study period. The exact timeline is not determined yet but planned are 3 scans on the day of injection, 1 scan on the first day after injection, 1 scan 4 days after injection and 1 scan a week after injection of the compound. Possible additional scans and sampling timepoints will be planned afterwards but will not take place in the first week after injection.

The experimental schedule for the PET-CT will first be mimicked with the use of a set of phantoms filled with the radiolabeled compound for homogeneity and image quality measurements. To determine the minimal scanning time necessary to obtain images with sufficient signal-to-noise ratio. This will be plotted in a graph to be able to couple the actual amounts of signal found in the animal over time with the scan time. Based on theory, this will be on average an hour but probably shorter (and more frequent) in the early timepoints after injection when the amount of activity is high and the alterations in distribution go fast. A longer scan time is not definitely necessary for the later time points as the target-to-background ratio is probably increasing over time meaning that there is less signal needed to obtain a sufficient signal-to-noise ratio only the amount of activity/signal is lower due to the natural decay.

For now, the last scan is scheduled at 1 week after injection, which means that there will be, at least, 3 weeks of recovery for the animals between the two study periods.

10.2.g the test compound, has been tested up to 30 mg in cynomolgus toxicity studies, using an IT injection, without any signs of toxicity. The planned study in cynomolgus macaques will use a dose of 4 mg which is at least > 5 times lower and will help us to refine our modelling. In addition, in the toxicity study

the maximum dose of 30 mg was tested with a flushing volume of 1.5 ml, the flushing volume leading to a 10-fold increase in dose in the brain. This was repeated 3 times in the same macaques. It is not expected that another 10-fold increase will be reached when increasing the flushing dose even further.

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

The number of macaques per test group will be determined on the basis of experience gained in *in vivo* experiments in rodents and macaques. It is expected that a group size of 3 macaques will suffice for the determination of the optimal IT administration method needed.

B. The animals

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

Species: Cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). Both rhesus macaques (*Macaca mulatta*) and Cynomolgus macaques are highly suitable to use for neurological research due to their comparability with humans in anatomy in regard to their ventricle-tissue shape and ratio. By this an increased pressure due to an increased amount of fluid in the IT space will result in a comparable differences and impact between cynomolgus macaques and humans. Nevertheless, differences will always be observed as they will also be present between healthy persons and patients, we try to mimic the situation as good as possible.

In this experiment we would prefer cynomolgus macaques as the previous experiments were also performed in this species (unpublished data). No gender differences were observed in the pharmacokinetic study so both sexes could be used. However, it is preferable to use one sex to diminish variability as the amount of CSF is in a certain way correlated to the physique of the body. The natural physique of the head of a female is smaller compared to male and in relation to that also the amount of CSF differs. Thus, the body composition influences the amount of CSF, to diminish this variable as much as possible, the use of one gender is preferred.

Although AS becomes clinical apparent at around 6-12 months of age in humans, we do not see the necessity to replicate this life-stage for non-human primates too, as the goal of this project is not directly disease related but optimisation of the injection technique. In addition, while aging the brain stays similar in structure.

Origin: all macaques are purpose bred. They are either bred at our institute or obtained from a certified supplier.

Amount: in this appendix there will be 2 experimental periods with 3 groups of 3 animals, resulting in a total of 9 macaques. Based on previous experiments with PK/PD studies in cynomolgus macaques with this compound this is sufficient to obtain reliable results.

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.

Macaques to be used in this project might have been used in previous studies, provided that this did not had any influence on the normal anatomy and physiology of the brain or on related processes like atherosclerosis or diabetes. Given the long lifespan of this species, re-use will take place in the legal framework described in art. 1 of the law on animal testing.

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 of animals.

Replacement

The goal is to find the administration technique that results in the highest drug concentration in the brain and is feasible to use in humans. Humans are the most optimal model to use, however, also for humans there will be a difference between patients and healthy persons. At this moment the macaque is necessary to translate the data from blood/CSF and concentration of the compound in the brain with the use of the PET-CT. The macaque data will later be compared to the data from the healthy human volunteers to learn more about the translatability from macaque to humans.

The anatomy of the brain and interactions with the rest of the body are highly specific, for this we do not think that both *in vitro* models or rodents are an option. As besides the differences in volume also the impact of the convective forces will influence the distribution (e.g. heartrate, blood pressure, breathing rate). It is impossible to mimic those forces *in vitro* as this will only provide limited information about what happens in a whole living species. Those forces, although different, will be present in rodents. However, the anatomy of the brain differs substantially. For this a species with comparable anatomy is required. Therefore, the use of a NHP model for studying the distribution of the test compound after IT injection in the CSF and brain is indispensable.

As other large animal species, like the cat, sheep, dog and pig, have drawbacks. Mainly due to their difference in brain anatomy; the relation of the cerebrum with the cerebellum and the anatomical differences in spinal canal length. This last point is important for the reliability of the IT injection. The final point why the macaque is the most optimal model for this project is because the previous experiments are also performed with the macaque. Choosing for another animal model means that the previous experiments have to be repeated before continuing with the experiments described in this protocol.

10.2 g

Though also in the healthy volunteers only a limited number of variables could be tested by which they are only partly an alternative. However, after those experiments we will be able to translate the results from animals to healthy volunteers by which it is unlikely that further animal experiments are necessary at least for this compound. In addition, those translational factors could also reduce the amount of animal experiments for similar type of compounds for future research purposes.

Reduction

Proper experimental design allows the ~~optimal~~ minimal number of animals to be used in this project in combined with data obtained in previous (pilot) experiments. Proper experimental design is based on diminishing the variables between animals as much as possible and with this increasing the likelihood on reliable results. Multiple points are considered; gender, pre-determination of the CSF-volume with MRI and pre-selection of the animals based on a 'weight-to-height'-index. The first two are already mentioned above and are related to the amount of CSF. The last one is related to the intrathecal injection. With this 'weight-to-height' index more information is available about the body composition of the animals and the amount of fat. An IT-injection is, in general, easier when not a lot of fat is present on the back of the animal. Incorporating a pre-defined range for this during the pre-selection will allow us to take this into account.

Refinement

We use macaques which are excellent models for studying our Research aims as their brain anatomy is highly similar to the human brain. Animals are kept in social groups and are housed in cages with enrichment. Improvements found during the experiments for included procedures which minimize pain and improve animal welfare will be directly included. Anesthetics are used, and analgesics are given as

precaution or as necessity afterwards. Also, macaques will be euthanized when they reach their human endpoint (see below) before the end of the study.

In addition, more specific for this protocol, we use PET-CT as minimal invasive imaging technique which allows us to obtain longitudinal information about the exact distribution of the drug instead of only a general overview obtained with CSF or blood. Besides this, it is an additional control to assess the IT injection.

Other refinement is the use of the same animals for both experiments in this project by which only one MRI at an external location needs to be obtained.

Performance measurements as stated in the NEMA (National Electrical Manufacturers Association) NU4-2008 standard for performance of preclinical PET imaging systems will be performed on forehand. In this way the minimal scan time necessary to obtain PET-CTs of sufficient quality will be determined with the use of phantoms. For this, those phantoms will be filled with a known amount of drug labeled with Zr-89 and afterwards PET scans will be obtained with a high frequency to be able to plot a curve of signal intensity versus image quality and scan time. This graph can be extrapolated for the scans obtained during the experiments in animals and optimize the scan time and with this the time that they are anesthetized.

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal. Additionally, animals are trained with positive reinforcement training to co-operate with injection of sedation and voluntary enter the transport box.

During the study animals will be observed twice daily after the first day of the injection by qualified and competent animal caretakers. On the first day, after the injection, this observation will be more intensive, the first 4 hours after injection a veterinarian will be continuously in the same room to monitor the animals. Afterwards another rounds of observation will be around 6 and 8 hours post injection. Taking the turnover time of CSF of macaques into account it is expected that within 5 hours the balance with in the brain is restored and with this the likelihood of acute side-effects. Nevertheless, cameras will be positioned into the stable to be able to monitor the macaques continuously. Should changes occur in behavior, appetite or stool then a veterinarian will be informed and appropriate measures will be implemented. On the basis of the scoring system a clinical human endpoint is defined (see section J). When this endpoint is (unexpectedly) reached, the animal will be immediately euthanized and a full necropsy will be performed to determine the cause of clinical disease. All procedures will be performed under sedation. On every time point where a procedure is performed the animal will be weighed and closely examined for clinical condition.

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.

Not applicable

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.

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.

The procedures will be performed on fully sedated animals. Pain relieve will be applied if there are any circumstances that indicate that pain can reasonably be expected to occur or animals show signs of illness indicative of pain. Analgesics known not to interfere with the experiment will be used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Discomfort due to the injection of the test compound
2. Stress because of sedation and recovery
3. Stress due to transport for obtaining an MRI to an external licensed institute.
4. Increased intercranial pressure

Explain why these effects may emerge.

1. The test compound has been tested till a dose at least 5 times higher than is planned in here with only transient and non-adverse clinical observations. Nevertheless, when the compound is applied via an IT injection, this can cause local pain and/or irritation.
2. The animals will be repeatedly sedated for procedures. Nausea and disorientation can sometimes be observed during recovery from the sedation.
3. Transport takes animals out of their environment which is stressful.
4. Although slowly, an amount of fluid is injected in the intrathecal space, by which the balance, following the Monro-Kellie hypothesis, in the brain will be disturbed.

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

1. Animals will be sedated for delivery of the test compound. Recovery of the animals will be monitored and the veterinarian will be consulted in case of problems/neurological alterations.
2. The side-effects of sedation cannot be antagonised. However, to prevent nausea and aspiration the animals will fast before sedation. Recovery of the animals will be monitored and the veterinarian will be consulted in case of problems.
3. The animals will be back within a couple of hours and will not stay in the external (licensed) institute. In addition, animals will be trained to voluntary enter the transport box.

4. The volume is injected as slowly as possible and heartbeat and blood pressure are continuously monitored. When an alteration is seen during injection, the injection is paused till the values returned back to the starting position.

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.

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

Based on the type of experiment a human endpoint is not expected. Though when neurological symptoms are observed (not expected based on the previous experiments but e.g. due meningitis or CSF leakage), directly the veterinarian will be consulted and appropriate action will be taken.

Indicate the likely incidence.

Based on experience, we anticipate a drop-out rate of <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 amount of discomfort for each experiment is judged as moderate, the total amount of discomfort is also estimated as moderate taken a wash-out period of 4 weeks into account. The discomfort is mainly caused by transport to another facility for the MRI, the sedation needed for collection of blood, CSF sampling and performing PET-CTs.

If due to unexpected circumstances, not related to the experiment, animals suffer discomfort then they will be taken out of study and will be humanely euthanized before it exceeds the level of moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

X No

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

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 DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

Aanvraagnummer: AVD 10.2.g 202011789

1. Titel van het project: Define optimal injection strategy of an antisense oligonucleotide (ASO) for Angelman Syndrome
2. Titel van de NTS: Bepalen van de optimale injectie strategie voor een antisense oligonucleotide voor Angelman Syndroom
3. Type aanvraag:
 - X nieuwe aanvraag projectvergunning
4. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: 10.2.g
 - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e
 - mailadres contactpersoon: 10.2.g
5. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ✓ ontvangen door DEC: 05-11-2020
 - ✓ aanvraag compleet: 01-02-2021
 - ✓ in vergadering besproken: 12-11-2020, 11-12-2020, 14-01-2021, 11-02-2021
 - ✓ anderszins behandeld
 - ✓ termijnonderbreking(en) van/tot 16-11-20 tot 3-12-20 en van 14-12-20 tot 7-1-21 en van 18-1-2021 tot 1-2-2021
 - ✓ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen op 25-01-2021
 - ✓ aanpassing aanvraag 3-12-2020, 7-1-2021, 1-2-2021
 - ✓ advies aan CCD: 19-02-2021

6. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD. De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

7. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.

- Datum: 11-12-2020
- Plaats: video conferentie
- Aantal aanwezige DEC-leden: 7
- Aanwezige (namens) aanvrager: 10.2.e
- Gestelde vraag/vragen:
 - Nadere toelichting op de schriftelijke antwoorden dd 3-12-2020. Met name is niet duidelijk wat de beoogde opbrengst van de studie is. Ook waren vragen die gesteld waren op 16-11-2020 onvoldoende helder beantwoord.
- Verstrek(e) antwoord(en)
 - De onderzoeker heeft helder uitgelegd wat het directe en uiteindelijke doel van de studie zijn. 10.2.g
- Het horen van de aanvrager en de daarbij gesteld schriftelijke vragen hebben geleid tot verdere aanpassing van de aanvraag (zie punt A8)

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 16-11-2020
- De gestelde vragen betroffen de volgende onderwerpen:
 - De onderbouwing van het doel van de studie
 - De onderbouwing van de strategie.
 - De relatie tussen deze studie in apen en in humane vrijwilligers

- Primaire uitkomst parameters en experimenteel design
 - Beschrijving handelingen
 - Verwijzing naar interne documenten
 - Onderbouwing keuze geslacht
 - Onderbouwing aantallen
 - Hergebruik
 - De 3V's
- Datum antwoord: 3-12-2020
 - Verstrek(e) antwoord(en):
 - De antwoorden waren niet geheel duidelijk en deels niet verwerkt in de aanvraag. Dit was een reden om de onderzoeker uit te nodigen om tijdens de vergadering van 11-12-2020 een nadere toelichting te geven. (zie A7)
 - De antwoorden hebben deels geleid tot aanpassing van de aanvraag.
- Datum: 14-12-2020
 - Gestelde vraag/vragen:
 - De onderbouwing van het doel van de studie
 - De onderbouwing van de strategie.
 - 10.2.g
 - Fasering dierstudie
 - Beschrijving handelingen
 - Verwijzing naar interne documenten (te verwijderen)
- Datum antwoord: 07-01-2021
 - Verstrek(e) antwoord(en): De antwoorden waren niet geheel duidelijk en deels niet verwerkt in de aanvraag.
- Datum: 15-01-2020
 - Gestelde vraag/vragen:
 - De relatie tussen deze studie in apen en de klinische studies (eerst in vrijwilligers)
 - Onderbouwing dosering
 - De onderbouwing van de strategie.
 - Beschrijving handelingen
 - Alternatieven
 - Verstrek(e) antwoorden: Alle vragen/opmerkingen zijn naar tevredenheid beantwoord en verwerkt in de bijgestelde projectaanvraag

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC). N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunning-plichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren: De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen kennis over farmacokinetiek/-dynamiek, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op het gebied van ontwerp van proeven, statistiek, de proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, de ethiek en van proefdieren en hun bescherming.
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Er waren geen conflicterende belangen bij de beoordeling van dit voorstel.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

Dit project betreft een preklinische studie naar de farmacokinetiek (PK) en distributie in het doelorgaan van een anti-sense-oligonucleotide (ASO) bedoeld als therapie voor Angelman syndroom (AS). Parallel aan een studie in vrijwilligers zal een uitgebreide studie worden uitgevoerd in Java apen om de verdeling van de toegediende ASO in het lichaam, met name in het brein, te bepalen en de optimale strategie voor intrathecale injectie vast te stellen. Momenteel is er nog geen werkzame therapie beschikbaar voor AS. Door gebruik te maken van de ASO **10.2.g** is het wellicht mogelijk het genetisch defect, dat aan dit syndroom ten grondslag ligt, op te heffen, waardoor de gevolgen van het defect worden gereduceerd. Echter er is nog weinig ervaring met de wijze van toediening met deze ASO, een stof die noodzakelijkerwijs in het brein terecht moet komen en daarom intrathecally (IT) moet worden geïnjecteerd. Het is daarom noodzakelijk uit te zoeken welke injectietechniek de beste resultaten oplevert. Door een studie in apen uit te voeren is het mogelijk te onderzoeken met welke injectietechniek de hoogste concentratie van de ASO in het gehele brein kan worden

bereikt. In eerder onderzoek in Java apen is gevonden dat het toedienen van extra vloeistof na de IT injectie van deze ASO leidt tot een hogere concentratie in het brein. In deze voorgaande studie werd uitsluitend gekeken naar de ASO *in situ* en de verhoogde expressie van het UBE3A eiwit. In de huidige studie zal de optimale toedieningstechniek worden bepaald, die dan beschikbaar is voor klinische studie met vrijwilligers. Tevens zal de concentratie en distributie van de ASO met PET/CT technieken (niet-invasieve technieken, waarmee herhaaldelijk metingen in een individu kunnen worden verkregen) worden bepaald en deze gegevens zullen worden gebruikt om de relatie tussen de met PET/CT gemeten concentraties van de ASO te correleren aan de resultaten van de eerdere studie in Java apen, waarin de concentraties werden bepaald met behulp van invasieve methoden en (moleculair-)biologische technieken. Vervolgens zullen deze gegevens worden gebruikt voor een nauwkeurige voorspelling van de distributie van de ASO in het humane brein bij vrijwilligers en tenslotte bij AS patiënten. De bevindingen en de gebruikte injectietechnieken in apen zijn leidend voor het opzetten van studies met patiënten. De aanvraag heeft een duidelijk omschreven en concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is het ook duidelijk met welk ongerief individuele dieren zullen worden geconfronteerd. In de eerste fase zal het effect van naspoelen met extra vloeistof op de distributie van de ASO over het brein na intrathecale injectie worden onderzocht. Aangezien drukverhoging in het brein geassocieerd kan worden met hoofdpijn, zal in de tweede fase worden onderzocht of het verwijderen van een deel van de CSF voor toediening van de ASO vergelijkbare resultaten oplevert als in de eerste fase met als groot voordeel minder bijwerkingen (als gevolg van een verhoogde druk in het brein). De volumes die gebruikt zullen worden in de tweede fase zullen gebaseerd zijn op de uitkomsten van de eerste fase. De DEC is ervan overtuigd dat er gedurende de looptijd van het project op zorgvuldige wijze besluiten zullen worden genomen over de voortgang van het onderzoek en dat er niet onnodig dieren zullen worden gebruikt. De DEC vindt dat het project toetsbaar is en voldoende samenhang heeft om aangemerkt te worden als een project.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën)

aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De aangegeven doelcategorieën, te weten ‘translationeel of toegepast onderzoek’ sluiten aan bij het projectvoorstel. In dit projectvoorstel zal worden onderzocht wat de optimale injectietechniek is van ASO 10.2 g in apen en de resultaten zullen direct worden vergeleken met de resultaten in humane vrijwilligers. Door deze vergelijking is het vervolgens mogelijk betere conclusies te trekken uit de studie in vrijwilligers met als doel de beste injectietechniek te vinden voor AS patiënten.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

Het directe doel van dit project is een optimale injectietechniek te vinden voor het IT toedienen van de ASO 10.2 g. Tevens zal het effect van de injectietechniek, welke in een klinisch onderzoek in vrijwilligers wordt gebruikt, worden geëvalueerd. Het uiteindelijke doel is de beste injectietechniek te vinden voor deze ASO bij AS patiënten. Het voorgestelde project is belangrijk omdat in de apenstudie meer parameters gemeten kunnen worden dan bij humane vrijwilligers. Door deze detail PET/CT studie in apen kunnen vervolgens uit de PET/CT resultaten bij humane vrijwilligers beter onderbouwde conclusies getrokken worden over de concentratie en verdeling van het ASO in het brein in de tijd. Dat laatste is belangrijk, gezien de belastende omstandigheden van IT toediening bij patiënten. De resultaten van de studies in niet-humane primaten en humane vrijwilligers kunnen vervolgens dienen om de meest optimale dosis en injectietechniek voor AS patiënten te bepalen.

Er is binnen dit onderzoek een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

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 belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, AS patiënten en hun sociale omgeving, de aanvragende onderzoeksinstituten, het bedrijf dat de ASO ontwikkelt voor klinische toepassing en de wetenschap.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. Er is sprake van instrumenteel gebruik, de dieren zullen door de huisvesting in een onderzoeksfaciliteit beperkt

worden in hun natuurlijke gedrag. De dieren zullen stress ondervinden door biotechnische handelingen en door vervoer naar het instituut waar MRI-metingen worden verricht en mogelijk enige mate van pijn.

Het belang voor de patiënten is dat er uiteindelijk een goede injectietechniek komt voor 10.2.g voor de behandeling van AS, een ziekte met aanzienlijke functiebeperkingen. Dit kan resulteren in verbeterde kwaliteit van leven voor de patiënten en hun naasten en beperking van de uitgaven voor verpleging, medicatie en zorg.

Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie, die meer inzicht kan geven in de waarde van PET/CT bepalingen bij het optimaliseren van IT-injectietechniek van een ASO, bestemd voor toepassing bij de mens. Deze informatie zal middels wetenschappelijke publicaties met het onderzoeksveld worden gedeeld. Voor het bedrijf, dat de ASO ontwikkelt voor klinische toepassing, is het belangrijk dat de klinische studies optimaal worden voorbereid, waardoor de kans dat de ASO therapie uiteindelijk op de markt kan worden gebracht, groter is. Dit is voor het bedrijf een economisch belang. Het is evident dat dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken? Er zijn geen substantiële milieueffecten te verwachten binnen de kaders of ten gevolge van dit project. De risico's worden beheerst door goede inperking en stralenbescherming.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.
De onderzoeksgroep heeft een ruime ervaring met PET/CT onderzoek in niet-humane primaten, het intrathecaal (IT) injecteren bij apen en uitgebreide ervaring met het verrichten van PK/PD studies in niet-humane primaten.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.
De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet sluit hier logisch op aan. Eerst wordt per dier, eenmalig, de 3D-anatomie van brein en ventrikels bepaald met MRI. Vervolgens zullen verschillende IT-injectietechnieken worden uitgevoerd om na te gaan welke de hoogste concentratie ASO in het brein tot gevolg heeft (te bepalen met PET/CT). Hierbij

zal waarschijnlijk drukverhoging in het brein optreden, hetgeen kan leiden tot vervelende bijwerking. Daarom zal in de volgende fase voor de beste van de drie in de eerste fase onderzochte injectietechnieken onderzocht worden of met het vooraf verwijderen van een hoeveelheid CSF een vergelijkbare verhoging van de concentratie ASO kan worden bereikt met minder drukverhoging in de hersenen, en dus met minder bijwerkingen. Vervolg-scans geven inzicht in de verblijfsduur van het label en dus de AS. De aanvrager heeft ervaring met PET/CT technieken en met IT-injectietechnieken van teststoffen. De commissie is ervan overtuigd dat met de voorgestelde aanpak de doelen gehaald kunnen worden.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod), voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op voorafgaande studies in Java apen met hetzelfde ASO, en de vertaalbaarheid naar de mens. De anatomie van het brein en het ruggenmerg van de aap maakt deze diersoort het meest geschikt voor een studie waarbij het gaat om de verdeling van een middel in het brein na IT toediening. Keuze voor een andere diersoort maakt de vertaalbaarheid naar de mens minder goed mogelijk en minder overtuigend. 10.2.g

Hergebruik is mogelijk en wenselijk vanwege de lange levensduur van de dieren, het feit dat ze met oog op gebruik in onderzoek zijn gefokt, en hun adaptatie aan de plaatselijke omstandigheden. Hergebruik zal plaatsvinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven. De DEC is het eens met hergebruik van de dieren om deze redenen.

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 huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III van de richtlijn.
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.
Het ongerief voor de dieren is correct als matig ingeschat. Het ongerief zal vooral veroorzaakt worden door transport naar een MRI-faciliteit, en de toepassing van anesthesie voor de MRI-scan, IT-injecties van de ASO, het afnemen van bloed en CSF en het uitvoeren van PET/CT scans onder sedatie.
12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.
De integriteit van de dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik. De experimentele procedures geven geen blijvende lichamelijke veranderingen.
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.
Het bereiken van een humaan eindpunt is goed gedefinieerd en toegespitst op de aard van de handelingen. Dieren zullen niet onnodig lijden omdat de dieren direct uit de proef genomen zullen worden en adequaat behandeld zullen worden mochten er complicaties optreden. Het instituut heeft veel ervaring op het gebied van IT-injectie van stoffen en de commissie acht het waarschijnlijk dat bij geen van de dieren het humane eindpunt bereikt zal worden.
14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn.
In vitro kan een verdeling van ASO 10.2 g in het brein niet gemeten worden en is het noodzakelijk dit in een intact dier te bepalen. Andere diersoorten zoals knaagdieren maar ook grotere zoogdieren kunnen niet gebruikt worden omdat de anatomie van het brein en het ruggenmerg te veel verschillen van het humane brein en ruggenmerg. In vrijwilligers is het niet mogelijk de verschillende injectietechnieken, de herhaalde toedieningen en PET/CT metingen te doen die in apen wel gedaan kunnen worden. De studie in gezonde vrijwilligers dient om aan te

tonen welke concentratie van de ASO bereikt kan worden middels een PET/CT scan in vergelijking met deze studie in apen. Echter de dynamiek van de distributie en concentratie van de geïnjecteerd ASO 10.2.g bij vrijwilligers niet volledig in het brein bepaald worden. Dit kon wel in een hieraan voorafgaand experiment met dezelfde apensoort, waarvan de resultaten direct vergeleken zullen worden met de resultaten uit het huidige onderzoek. Door de huidige studie uit te voeren in Java apen kan die correlatie gelegd worden middels de verdeling in het brein van het PET/CT signaal en vervolgens vertaald worden naar resultaten bij gezonde vrijwilligers en uiteindelijk naar AS patiënten. De Java aap is daardoor bij uitstek geschikt voor dit onderzoek. Gebruik van andere diersoorten zou betekenen dat de eerder uitgevoerde experimenten betreffende de concentratie en distributie in het brein herhaald moeten worden.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

Het aantal te gebruiken dieren per groep is correct ingeschat op basis van voorgaande proeven met 10.2.g in Java apen. De onderzoeker zal 3 toedieningsprocedures in de eerste fase testen. Voor optimale vergelijking van injectietechnieken zullen de dieren uit de eerste fase ook in de tweede fase gebruikt worden.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe.

De uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van goed geadapteerde en sociaal gehuisveste dieren. Er zal anesthesie worden toegepast tijdens de onderzoeksprocedures. Dieren worden gedurende de gehele studie gemonitord door ervaren dierverzorgers en een klinische scorelijst wordt bijgehouden. De dieren staan onder veterinaire begeleiding.

Voordat de tweede fase van het project start zal in goed overleg met de IvD besloten worden welke volumina gebruikt zullen worden bij het vooraf verwijderen van CSF om daar mee de druk te verlagen. Hierbij zal gelet worden op de welzijnsaspecten van de dieren.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.

N.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

In onderhavige projectaanvraag worden dieren van één geslacht gebruikt. De onderzoeker geeft aan de het hoofd (schedel) van mannelijke en vrouwelijke dieren dermate verschillend zijn qua omvang dat gebruik van beide geslachten binnen één proef de betrouwbaarheid van de resultaten doet verminderen. Door dieren van hetzelfde geslacht te nemen zal de variatie in het hersenvolume tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en dit zal de variatie in de uitkomst parameters verkleinen. Er is geen sprake van overschotten.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. De dieren zullen niet worden gedood aan het einde van de studie.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. De dieren kunnen eerder in onderzoek zijn gebruikt en kunnen na afloop voor hergebruik bestemd worden, dit alles met inachtneming van overwegingen rond dierenwelzijn.

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het testen van de optimale intrathecale injectietechniek voor ASO 10.2.g het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan, en de aantasting van hun integriteit? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren, andere onderzoek modellen of patiënten? Wordt daarbij aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

Negen (9) Java apen zullen matig ongerief ondergaan. Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Het betreft dieren waarbij ASO 10.2.g IT wordt toegediend, waarbij regelmatig CSF en bloed wordt afgenomen en waarbij een MRI en diverse PET/CT scans worden uitgevoerd. De welzijnsaantasting kan resulteren in ongerief tijdens het vervoer naar de MRI-scanner en het bijkomen uit narcose na elke handeling. Ongerief en lijden zal zo veel mogelijk worden beperkt. Daarmee resulteert dit in maximaal matig ongerief voor de dieren.

De waarde voor de patiënten en de samenleving is het op termijn beschikbaar komen van een geneesmiddel voor AS. AS is een ernstige genetische aandoening waarvoor nog geen behandeling beschikbaar is. ASO 10.2.g kan een verbetering in het ziekteproces betekenen doordat dit het genetische defect dat ten grondslag ligt aan deze ziekte, kan repareren. Echter het op de juiste manier injecteren van dit middel dient te worden uitgezocht zodat een zo hoog mogelijke concentratie en optimale distributie in het brein kan worden bereikt. Dit kan niet in patiënten omdat door hun cognitieve beperkingen en ongecontroleerde bewegingen het ondergaan van een PET/CT scan niet mogelijk is. In gezonde vrijwilligers kan een beperkt aantal parameters worden bepaald, maar de distributie van de ASO over het brein in de tijd kan niet worden gevolgd. Door detail PET/CT studies in apen parallel uit te voeren met dezelfde toedieningswijze, kan een vertaalslag gemaakt worden van drug concentratie in bloed, CSF en PET/CT signaal naar de uit eerdere studies verkregen actuele drug concentraties in het brein. Concluderend, de voorgestelde dierstudie is een essentieel onderdeel van de studies naar de optimalisering van de toediening van een nieuwe, veelbelovende therapeuticum ter bestrijding/genezing van een zeer ernstige ziekte, te weten AS.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling: het testen van de optimale IT toedieningsprocedure voor ASO 10.2.g bij niet-humane primaten. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van een werkzame farmacologische behandeling voor AS. Er is nog geen geneesmiddel beschikbaar voor de behandeling van deze ernstige ziekte. AS is een aandoening die bij 1 op de 15000 mensen voorkomt. Patiënten hebben veel neurologische afwijkingen die maken dat deze patiënten hun leven lang 24 uur per dag zorg nodig hebben. ASO 10.2.g is erop gericht dit genetisch defect op te heffen, waardoor de kwaliteit van leven van deze patiënten aanzienlijk kan verbeteren. 10.2.g

10.2.g

De commissie vindt dit een substantieel belang voor zowel patiënten als maatschappij. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat het aannemelijk is dat de gekozen strategie en experimentele aanpak leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen de looptijd van het project. De aanvrager en aanvragende instantie hebben voldoende ervaring van het uitvoeren van experimenten met apen, specifiek met de biotechnische handelingen zoals PET/CT scans, IT injectie, PK en PD studies en het houden en verzorgen van apen. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat de doelen niet met minder dieren, of andere diersoorten, behaald kunnen worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat voorkomen wordt dat mens, dier en milieu onbedoelde negatieve effecten zullen ondervinden als gevolg van de dierproeven (C14, C15, C16). Het gebruik van niet-humane primaten wordt als noodzakelijk beoordeeld omdat de anatomie van brein en ruggenmerg van de aap het meest overeenkomt met dat van de mens. Hierdoor zullen effecten van de injectietechnieken op de verdeling van de ASO in het brein het beste voorspellen hoe uiteindelijk de resultaten in patiënten zullen zijn. Het is niet mogelijk dit uitsluitend te onderzoeken in gezonde vrijwilligers omdat bij vrijwilligers slechts een beperkt aantal parameters kan worden bepaald, de concentratie en distributie in de tijd in het brein niet exact is vast te stellen waardoor het niet mogelijk is de injectietechniek te optimaliseren uitsluitend in gezonde vrijwilligers. De DEC is

samenvattend van mening dat aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent de 3 V's en de kwaliteit van het onderzoek is voldaan en dat het hierboven genoemde belang voor de samenleving als geheel het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van welzijn en integriteit) rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

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

X 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. Het betreft hier niet-humane primaten.

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten: geen

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn bij de beoordeling van dit project geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.

Aan: voltallige commissie CCD

(cc 10.2.e)

Onderwerp: antwoord en herziene aanvraag projectvergunning dierproeven AVD 10.2.g 202011789

Datum: 08-03-2021

Geachte leden van de CCD

cc 10.2.e

Dank voor uw reactie op mijn aanvraag projectvergunning dierproeven AVD 10.2.g 202011789, getiteld: "*Define optimal injection strategy of an antisense oligonucleotide (ASO) for Angelman Syndrome*".

In de pagina's hieronder vindt u de geformuleerde antwoorden op de vragen die door de CCD zijn gesteld. Ik hoop dat deze antwoorden het voor u mogelijk maken om een ethische afweging te maken betreffende dit project.

Naast de hieronder beschreven antwoorden, heb ik ook de NTS aangepast en zijn de wijzigingen daarin in blauw gemarkeerd (er is ook een "schoon" NTS bijgevoegd).

Ik hoop u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groeten,

10.2.e

Niet technische samenvatting

Kunt u de term "in vitro technieken" uitleggen zodat deze voor een algemeen publiek te begrijpen is?

Het woord *in vitro* techniek is vervallen in de aangepast tekst on 4.1 en daarvoor is het begrip fantoom uitgelegd. Dat dit een plastic buis is waarmee het brein van een aap nagebootst kan worden. Door deze te vullen met dezelfde radioactieve vloeistof die we voor de scans gebruiken kunnen we dit nabootsen zonder dat we daar een aap voor nodig hebben. Op deze manier kunnen we exact bepalen welke scantijd en activiteit minimaal voldoende zijn voor het maken van een scan met voldoende signaal-ruis verhouding.

Onder 3.4 dient u een zo volledig en realistisch mogelijk beeld te schetsen van de handelingen aan de dieren. Er missen hier nog een aantal handelingen zoals bloed/CSF afname en PET-CT scan. Wij verzoeken u dit nog toe te voegen.

De tekst onder 3.4 is nu aangepast zodat deze overeenkomt met de punten die vermeld staan onder I in bijlage 1. Dus naast de injectie van de test stof en de MRI zijn ook de verhoogde druk door de intrathecale injectie benoemd en de stress veroorzaakt door de bloedafname, CSF afname en de PET-CTs.

Kunt u bij punt 4.3 de term "geëuthanaseerd" vermijden? Dit is verhullend taalgebruik.

Excuus hiervoor, dit is gewijzigd in; humaan gedood.

Onduidelijkheden

- In het projectvoorstel beschrijft u dat er verschillen kunnen zijn in CSF volume en anatomie van de hersenen tussen gezonde personen en AS patienten en dat er daarom meer data nodig is om de translatie van gezonde vrijwilligers naar de patiënt te maken. Toch gebruikt u gezonde java apen voor het project. Kunt u hier genoeg gegevens uithalen om de translatie stap te maken naar AS patienten?

Het klopt dat het volume en de anatomie van de AS patiënten afwijkt van gezonde personen, de mate van afwijking verschilt echter per patiënt. Waarmee er dus geen vaste lijn op te trekken is.

De evaluatie van de verdeling van een stof door het lichaam kan zowel *ex vivo* met een biodistributie worden gedaan waarbij het percentage van de geïnjecteerde dosis in weefsel wordt bepaald of *in vivo* met het dynamisch vervolgen van de verdeling in bloed/CSF of met behulp van beeldvormende technieken zoals PET waarbij de signaalintensiteit gekoppeld kan worden aan het percentage van de geïnjecteerde dosis. Tussen deze verschillende verdelingen kunnen correlaties gemaakt worden (1-4). Waarbij zowel de metingen in bloed/CSF en de *ex vivo* biodistributie gedaan kunnen worden met behulp van radioactiviteit maar dit is niet noodzakelijk (5). Dit is ook wat er in deze studie gepland staat. De *ex vivo* biodistributie en de metingen in bloed/CSF zijn al uitgevoerd zonder radioactiviteit door onze samenwerkende partner in Java apen. Door dezelfde injectiemethode te gebruiken voor 1 groep, maar nu met een radioactief label eraan kan de verdeling van de stof over tijd vervolgd worden. Dit kan dan zowel in het bloed als met de PET en dit kan gecorreleerd worden aan de eerder verkregen gegevens. Op deze manier kunnen we in makaken de vertaalslag maken van PET-CT beeld naar werkelijke lokale drug concentratie.

In gezonde vrijwilligers wordt dit herhaald en wordt er ook bloed/CSF afgenomen en een PET gemaakt. De data gevonden in de makaak en in de gezonde vrijwilliger kunnen dan met elkaar vergeleken worden.

Ondanks dat mensen en makaken nauw verwant aan elkaar zijn, zijn er ook hier verschillen tussen de anatomie en vooral ook het CSF volume te vinden. Doordat van zowel gezonde apen als gezonde

vrijwilligers data op dezelfde manier verkregen wordt kunnen deze resultaten geïnterpoleerd worden in combinatie met de hoeveelheid teststof die er gevonden wordt. AS patiënten zullen in dit tussenliggende gebied bevinden.

Het valt op dat de aangevraagde periode oktober 2020-november 2022 is. Aangezien de aangevraagde begindatum al enkele maanden in het verleden ligt kan de CCD zich voorstellen dat u problemen krijgt de onderzoeken voor het einde van de looptijd af te ronden. De CCD stelt u daarom in de gelegenheid de termijn voor dit onderzoek aan te passen. Graag reactie per mail of antwoordbrief als u hiervan gebruik wilt maken.

Graag zou ik van de gelegenheid gebruik willen maken om deze aan te passen naar een startdatum van 1 april 2021.

Referenties

1. Neumann KD, Blecha JE, Hayes TR, Huynh T, Chao CK, Guilloteau N, et al. Radiosynthesis, ex Vivo Biodistribution, and in Vivo Positron Emission Tomography Imaging Evaluations of $[(11)\text{C}]2$ -Pyridinealdoxime Methiodide ($[(11)\text{C}]2$ -PAM): A First-In-Class Antidote Tracer for Organophosphate Intoxication. *ACS Chem Neurosci*. 2018;9(12):3007-14.
2. Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;87:46-51.
3. Cheng Z, Wei R, Wu C, Qing H, Jiang X, Lu H, et al. Ex-vivo biodistribution and micro-PET/CT imaging of ^{18}F -FDG, ^{18}F -FLT, ^{18}F -FMISO, and ^{18}F -AIF-NOTA-PRGD2 in a prostate tumor-bearing nude mouse model. *Nucl Med Commun*. 2015;36(9):914-21.
4. Li D, Cheng S, Zou S, Zhu D, Zhu T, Wang P, et al. Immuno-PET Imaging of $(89)\text{Zr}$ Labeled Anti-PD-L1 Domain Antibody. *Mol Pharm*. 2018;15(4):1674-81.
5. Rigo F, Chun SJ, Norris DA, Hung G, Lee S, Matson J, et al. Pharmacology of a central nervous system delivered 2'-O-methoxyethyl-modified survival of motor neuron splicing oligonucleotide in mice and nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;350(1):46-55.

Aan: voltallige commissie CCD

(cc 10.2.e)

Onderwerp: antwoord en herziene aanvraag projectvergunning dierproeven AVD 10.2.g 202011789

Datum: 15-03-2021

Geachte leden van de CCD

cc 10.2.e

Dank voor uw reactie op mijn aanvraag projectvergunning dierproeven AVD 10.2.g 202011789, getiteld: "*Define optimal injection strategy of an antisense oligonucleotide (ASO) for Angelman Syndrome*".

In de pagina hieronder vindt u het geformuleerde antwoord op de nadere vraag die door de CCD is gesteld. Ik hoop dat dit antwoord het voor u mogelijk maken om een ethische afweging te maken betreffende dit project.

Met vriendelijke groeten,

10.2.e

Onduidelijkheden

U geeft aan dat u maar 1 geslacht gebruikt voor de experimenten om variatie te verminderen, aangezien de hoeveelheid CSF verschilt tussen mannetjes en vrouwtjes. Het gaat om preklinisch onderzoek voor een behandeling die in de toekomst voor AS patiënten beschikbaar zou moeten worden. Is het in het kader van transleerbaarheid niet verstandiger om beide geslachten in te zetten? Kunt u beargumenteren waarom u toch maar 1 geslacht gebruikt?

Wanneer dit onderzoek getest zou worden op apen met AS zou ik het volledig met u eens zijn dat dit zelfs op beide geslachten getest moet worden. Echter omdat we hier de invloed van de intrathecale injectietechniek willen bekijken geldt dit niet. Het doel van dit project is het uitsluiten van het feit dat de verschillen tussen de injectietechnieken niet veroorzaakt worden door verschillen in de hoeveelheid CSF.

Daarnaast is het voor de transleerbaarheid niet noodzakelijk omdat de variatie tussen mannen en vrouwen en daarmee van de hoeveelheid CSF in de gezonde vrijwilligers getest gaat worden. Deze uitkomsten kunnen allemaal op 1 lijn uitgezet kan worden, zodat dit op die manier naar de AS patiënten getransleerd kan worden. Het is hierbij van belang dat de uitkomsten bij de aap zo homogeen mogelijk zijn zodat de bandbreedte zo smal mogelijk blijft. Wanneer we dus variatie in de hoeveelheid CSF gaan introduceren betekent dit dat we de dubbele hoeveelheid dieren nodig gaan hebben om data met eenzelfde betrouwbaarheid te genereren. Met deze afwegingen in ons achterhoofd en het gebruik van zo min mogelijk dieren om betrouwbare data te genereren is het gebruik van één sekse voldoende.



Advies aan CCD

Datum 22 maart 2021
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202011789

Instelling: 10.2.g
Onderzoeker: 10.2.e
Project: Define optimal injection strategy of an antisense oligonucleotide (ASO) for Angelman Syndrome
Aanvraagnummer: AVD202011789
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	<p>In januari heeft de DEC telefonisch contact opgenomen met het Secretariaat om extra tijd te vragen. De DEC heeft uitgelegd dat de aanvrager moeite heeft om de aanvraag op papier te krijgen, waardoor de DEC na 2 vragenrondes de aanvraag nog niet voldoende duidelijk vond en een extra vragenronde heeft moeten gebruiken. Het Secretariaat heeft naar aanleiding van deze uitleg van de DEC de aanvraag complex gemaakt.</p> <p>Het Secretariaat heeft de volgende vragen gesteld aan de aanvrager:</p> <ul style="list-style-type: none">- In het projectvoorstel beschrijft u dat er verschillen kunnen zijn in CSF volume en anatomie van de hersenen tussen gezonde personen en AS patiënten en dat er daarom meer data nodig is om de translatie van gezonde vrijwilligers naar de patiënt te maken. Toch gebruikt u gezonde java apen voor het project. Kunt u hier genoeg gegevens uithalen om de translatie stap te maken naar AS patiënten?- Het valt op dat de aangevraagde periode oktober 2020-november 2022 is. Aangezien de aangevraagde begindatum al enkele maanden in het verleden ligt kan de CCD zich voorstellen dat u problemen krijgt de onderzoeken voor het einde van de looptijd af te ronden. De CCD stelt u daarom in de gelegenheid de termijn voor dit onderzoek aan te passen. Graag reactie per mail of antwoordbrief als u hiervan gebruik wilt maken. <p>Vragen over de NTS:</p> <ul style="list-style-type: none">- Kunt u de term "in vitro technieken" uitleggen zodat deze voor een algemeen publiek te begrijpen is?
---------------	---

<p>- Onder 3.4 dient u een zo volledig en realistisch mogelijk beeld te schetsen van de handelingen aan de dieren. Er missen hier nog een aantal handelingen zoals bloed/CSF afname en PET-CT scan. Wij verzoeken u dit nog toe te voegen.</p> <p>- Kunt u bij punt 4.3 de term "geëuthanaseerd" vermijden? De CCD beschouwt dit als verhullend taalgebruik.</p>				
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1. Determining the optimal IT injection for 10.2.g in a healthy cynomolgus macaque model.				
	Java-apen (Macaca fascicularis)		9	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Niet menselijke primaten

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1. Determining the optimal IT injection for 10.2.g in a healthy cynomolgus macaque model.

Java-apen (Macaca fascicularis)

Citaat: No gender differences were observed in the pharmacokinetic study so both sexes could be used. However, it is preferable to use one sex to diminish variability as the amount of CSF is in a certain way correlated to the physique of the body. The natural physique of the head of a female is smaller compared to male and in relation to that also the amount of CSF differs. Thus, the body composition influences the amount of CSF, to diminish this variable as much as possible, the use of one gender is preferred.

Het betreft onderzoek in niet-humane primaten. De aanvraag onderbouwt de keuze hiervoor als volgt:

Humans are the most optimal model to use, however, also for humans there will be a difference between patients and healthy persons. At this moment the macaque is necessary to translate the data from blood/CSF and concentration of the compound in the brain with the use of the PET-CT. The macaque data will later be compared to the data from the healthy human volunteers to learn more about the translatability from macaque to humans. The anatomy of the brain and interactions with the rest of the body are highly specific, for this we do not think that both in vitro models or rodents are an option. As besides the differences in volume also the impact of the convective forces will influence the distribution (e.g. heartrate, blood pressure, breathing

rate). It is impossible to mimic those forces in vitro as this will only provide limited information about what happens in a whole living species. Those forces, although different, will be present in rodents.

However, the anatomy of the brain differs substantially. For this a species with comparable anatomy is required. Therefore, the use of a NHP model for studying the distribution of the test compound after IT injection in the CSF and brain is indispensable.

As other large animal species, like the cat, sheep, dog and pig, have drawbacks. Mainly due to their difference in brain anatomy; the relation of the cerebrum with the cerebellum and the anatomical differences in spinal canal length. This last point is important for the reliability of the IT injection. The final point why the macaque is the most optimal model for this project is because the previous experiments are also performed with the macaque. Choosing for another animal model means that the previous experiments have to be repeated before continuing with the experiments described in this protocol.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
Maatschappij	11.1

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaten uit het DEC advies:</p> <p>C9 (bijzondere categorieën): <input type="checkbox"/> Niet-menselijke primaten (10e) <input type="checkbox"/> Hergebruik (1e, lid 2)</p> <p>De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op voorafgaande studies in Java apen met hetzelfde ASO, en de vertaalbaarheid naar de mens. De anatomie van het brein en het ruggenmerg van de aap maakt deze diersoort het meest geschikt voor een studie waarbij het gaat om de verdeling van een middel in het brein na IT toediening. Keuze voor een andere diersoort maakt de vertaalbaarheid naar de mens minder goed mogelijk en minder overtuigend. 10.2.g</p> <p>Hergebruik is mogelijk en wenselijk vanwege de lange levensduur van de dieren, het feit dat ze met oog op gebruik in onderzoek zijn gefokt, en hun adaptatie aan de plaatselijke omstandigheden. Hergebruik zal plaatsvinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven. De DEC is het eens met hergebruik van de dieren om deze redenen.</p> <p>C18 (geslachten): In onderhavige projectaanvraag worden dieren van één geslacht gebruikt. De onderzoeker geeft aan de het hoofd (schedel)</p>
-------------------	--

van mannelijke en vrouwelijke dieren dermate verschillend zijn qua omvang dat gebruik van beide geslachten binnen één proef de betrouwbaarheid van de resultaten doet verminderen. Door dieren van hetzelfde geslacht te nemen zal de variatie in het hersenvolume tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en dit zal de variatie in de uitkomst parameters verkleinen. Er is geen sprake van overschotten.

Ethische afweging van de DEC:

1. Rechtvaardigt het testen van de optimale intrathecale injectietechniek voor 10.2.g het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan, en de aantasting van hun integriteit? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren, andere onderzoek modellen of patiënten? Wordt daarbij aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

2. Negen (9) Java apen zullen matig ongerief ondergaan. Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Het betreft dieren waarbij 10.2.g wordt toegediend, waarbij regelmatig CSF en bloed wordt afgenomen en waarbij een MRI en diverse PET/CT scans worden uitgevoerd.

De welzijnsaantasting kan resulteren in ongerief tijdens het vervoer naar de MRI-scanner en het bijkomen uit narcose na elke handeling. Ongerief en lijden zal zo veel mogelijk worden beperkt.

Daarmee resulteert dit in maximaal matig ongerief voor de dieren.

De waarde voor de patiënten en de samenleving is het op termijn beschikbaar komen van een geneesmiddel voor AS. AS is een ernstige genetische aandoening waarvoor nog geen behandeling beschikbaar is.

10.2.g kan een verbetering in het ziekteproces betekenen doordat dit het genetische defect dat ten grondslag ligt aan deze ziekte, kan repareren. Echter het op de juiste manier injecteren van dit middel dient te worden uitgezocht zodat een zo hoog mogelijke concentratie en optimale distributie in het brein kan worden bereikt. Dit kan niet in patiënten omdat door hun cognitieve beperkingen en ongecontroleerde bewegingen het ondergaan van een PET/CT scan niet mogelijk is. In gezonde vrijwilligers kan een beperkt aantal parameters worden bepaald, maar de distributie van de ASO over het brein in de tijd kan niet worden gevolgd. Door detail PET/CT studies in apen parallel uit te voeren met dezelfde toedieningswijze, kan een vertaalslag gemaakt worden van drug concentratie in bloed, CSF en PET/CT signaal naar de uit eerdere studies verkregen actuele drug concentraties in het brein. Concluderend, de voorgestelde dierstudie is een essentieel onderdeel van de studies naar de optimalisering van de toediening van een nieuwe, veelbelovende

therapeuticum ter bestrijding/genezing van een zeer ernstige ziekte, te weten AS.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling: het testen van de optimale IT toedieningsprocedure voor 10.2.g bij niet-humane primaten. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van een werkzame farmacologische behandeling voor AS. Er is nog geen geneesmiddel beschikbaar voor de behandeling van deze ernstige ziekte. AS is een aandoening die bij 1 op de 15000 mensen voorkomt. Patiënten hebben veel neurologische afwijkingen die maken dat deze patiënten hun leven lang 24 uur per dag zorg nodig hebben. 10.2.g is erop gericht dit genetisch defect op te heffen, waardoor de kwaliteit van leven van deze patiënten aanzienlijk kan verbeteren. 10.2.g

De commissie vindt dit een substantieel belang voor zowel patiënten als maatschappij. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat het aannemelijk is dat de gekozen strategie en experimentele aanpak leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen de looptijd van het project. De aanvrager en aanvragende instantie hebben voldoende ervaring van het uitvoeren van experimenten met apen, specifiek met de biotechnische handelingen zoals PET/CT scans, IT injectie, PK en PD studies en het houden en verzorgen van apen. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat de doelen niet met minder dieren, of andere diersoorten, behaald kunnen worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat voorkomen wordt dat mens, dier en milieu onbedoelde negatieve effecten zullen ondervinden als gevolg van de dierproeven (C14, C15, C16). Het gebruik van niet-humane primaten wordt als noodzakelijk beoordeeld omdat de anatomie van brein en ruggenmerg van de aap het meest overeenkomt met dat van de mens. Hierdoor zullen effecten van de injectietechnieken op de verdeling van de ASO in het brein het beste voorspellen hoe uiteindelijk de resultaten in patiënten zullen zijn. Het is niet mogelijk dit uitsluitend te onderzoeken in gezonde vrijwilligers omdat bij vrijwilligers slechts een beperkt aantal parameters kan worden bepaald, de concentratie en distributie in de tijd in het brein niet exact is vast te stellen waardoor het niet mogelijk is de injectietechniek te optimaliseren uitsluitend in gezonde vrijwilligers. De DEC is samenvattend van mening dat aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent de 3 V's en de kwaliteit van het onderzoek is voldaan en dat het hierboven genoemde belang voor de samenleving als geheel het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van welzijn en integriteit) rechtvaardigt.

	<p>De DEC heeft extern advies ingewonnen bij</p> <p>- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd</p> <p>Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden</p> <p>Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.</p>
--	--

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>Het valt op dat u erg veel vragen heeft gesteld. Hoewel dit ongetwijfeld heeft bijgedragen aan de kwaliteit en duidelijkheid van de aanvraag, heeft het de voorkeur om 1 tot maximaal 2 vragenrondes aan te houden. Het houden van meer dan 2 vragenrondes kan leiden tot overschrijding van de behandeltermijn en het kan de suggestie wekken dat de DEC "meeschrijft" aan de aanvraag. Wij hebben dit ook telefonisch met u besproken, en u heeft aangegeven dat u zich hiervan bewust bent, maar voor deze specifieke aanvraag een uitzondering moest maken. U heeft wel tijdig kenbaar gemaakt dat de behandeling van deze aanvraag extra tijd zou gaan kosten, dit wordt gewaardeerd.</p>
-----------------------------	--

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	<p>Citaat: The main objectives of this project are: to determine in NHP which IT injection technique results in the highest concentration for 10.2.g in the brain; to establish the biodistribution of 10.2.g; and to compare the PET-CT signal in NHPs to PET-CT signals in healthy volunteers.</p> <p>The goal is to determine which IT administration method leads to the highest concentration of 10.2.g in the brain. For this ASOs will be IT injected in cynomolgus macaques, followed by CSF and blood sampling and PET-CT. One of those administration methods will later on be used in the healthy volunteer study. The ultimate goal is to generate a safe, effective and tolerable treatment for AS patients.</p>
-------------------------------------	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: Social. Angelman Syndrome is a debilitating neurodevelopmental disorder in which intellectual functions, social communication, cognition and behaviour are separately impaired which has a substantial impact on the quality of life of patients with e.g. sleep problems, seizures, gastrointestinal problems and disruptive/aggressive behaviours. At present, there is no specific treatment only supportive treatment available for AS which consists only of suppression of the symptoms. With this new approach, a more targeted treatment will be developed, which could result in alleviation of the physical problems, improving the mental skills and quality of life of these people.</p> <p>Scientific. While the distribution of a compound is dependent on its specific chemical characteristics the results obtained in this study will give more information about the interaction between the pressure and amount of fluid in the IT space, in combination with the convective forces on the distribution of compounds in the brain. The results generated will be published to optimize IT injections for humans in the future.</p> <p>In this project, we will analyse the compound distribution in healthy macaque brains using different application methods (determine optimal flushing volume resulting in highest drug concentration in the brain and testing whether replacement of macaque CSF has impact on the tissue distribution of the compound). The results from this experiment will be used to design a protocol for optimal administration of this compound in humans, resulting in pharmacological brain exposure and best benefit risk ratio. The risk is that the dose is too low and the patient will not benefit enough from the treatment. The risk of dosing to high is low and unlikely as we are covered by the NHP toxicity studies already performed with doses which were at least 5 times higher than planned in this study. This enhances the chance of a positive outcome for the clinical trials with AS patients.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1 [redacted]
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/onderzoeksgroep en onderzoek	Citaat C7 uit het DEC advies: De onderzoeksgroep heeft een ruime ervaring met PET/CT onderzoek in niet-humane primaten, het intrathecaal (IT) injecteren bij apen en uitgebreide ervaring met het verrichten van PK/PD studies in niet-humane primaten. 11.1 [redacted]

3V's

Vervanging

3.4.4.1. Determining the optimal IT injection for 10.2.g in a healthy cynomolgus macaque model.:

Citaat: The goal is to find the administration technique that results in the highest drug concentration in the brain and is feasible to use in humans. Humans are the most optimal model to use, however, also for humans there will be a difference between patients and healthy persons. At this moment the macaque is necessary to translate the data from blood/CSF and concentration of the compound in the brain with the use of the PET-CT. The macaque data will later be compared to the data from the healthy human volunteers to learn more about the translatability from macaque to humans.

The anatomy of the brain and interactions with the rest of the body are highly specific, for this we do not think that both in vitro models or rodents are an option. As besides the differences in volume also the impact of the convective forces will influence the distribution (e.g. heartrate, blood pressure, breathing rate). It is impossible to mimic those forces in vitro as this will only provide limited information about what happens in a whole living species. Those forces, although different, will be present in rodents.

However, the anatomy of the brain differs substantially. For this a species with comparable anatomy is required. Therefore, the use of a NHP model for studying the distribution of the test compound after IT injection in the CSF and brain is indispensable.

As other large animal species, like the cat, sheep, dog and pig, have drawbacks. Mainly due to their difference in brain anatomy; the relation of the cerebrum with the cerebellum and the anatomical differences in spinal canal length. This last point is important for the reliability of the IT injection. The final point why the macaque is the most optimal model for this project is because the previous experiments are also performed with the macaque. Choosing for another animal model means that the previous experiments have to be repeated before continuing with the experiments described in this protocol.

10.2.g

Though also in the healthy volunteers only a limited number of variables could be tested by which they are only partly an alternative. However, after those experiments we will be able to translate the results from animals to healthy volunteers by which it is unlikely that further animal experiments are necessary at least for this compound. In addition, those translational factors could also reduce the amount of animal experiments for similar type of compounds for future research purposes.

Verminderen	
	<p>3.4.4.1. Determining the optimal IT injection for 10.2.g in a healthy cynomolgus macaque model.: Citaat: Proper experimental design allows the optimal minimal number of animals to be used in this project in combined with data obtained in previous (pilot) experiments. Proper experimental design is based on diminishing the variables between animals as much as possible and with this increasing the likelihood on reliable results. Multiple points are considered; gender, pre-determination of the CSF-volume with MRI and pre-selection of the animals based on a 'weight-to-height'-index. The first two are already mentioned above and are related to the amount of CSF. The last one is related to the intrathecal injection. With this 'weight-to-height' index more information is available about the body composition of the animals and the amount of fat. An IT-injection is, in general, easier when not a lot of fat is present on the back of the animal. Incorporating a pre-defined range for this during the pre-selection will allow us to take this into account.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.4.1. Determining the optimal IT injection for 10.2.g in a healthy cynomolgus macaque model.: Citaat: We use macaques which are excellent models for studying our Research aims as their brain anatomy is highly similar to the human brain. Animals are kept in social groups and are housed in cages with enrichment. Improvements found during the experiments for included procedures which minimize pain and improve animal welfare will be directly included. Anesthetics are used, and analgesics are given as precaution or as necessity afterwards. Also, macaques will be euthanized when they reach their human endpoint (see below) before the end of the study.</p> <p>In addition, more specific for this protocol, we use PET-CT as minimal invasive imaging technique which allows us to obtain longitudinal information about the exact distribution of the drug instead of only a general overview obtained with CSF or blood. Besides this, it is an additional control to assess the IT injection.</p> <p>Other refinement is the use of the same animals for both experiments in this project by which only one MRI at an external location needs to be obtained.</p> <p>Performance measurements as stated in the NEMA (National Electrical Manufacturers Association) NU4- 2008 standard for performance of preclinical PET imaging systems will be performed on forehand. In this way the minimal scan time necessary to obtain PET-CTs of sufficient quality will be determined with the use of phantoms. For this, those phantoms will be filled with a known amount of drug labeled with Zr-89 and afterwards PET scans will be obtained with a high frequency to be able to plot a curve of signal intensity versus image quality and scan</p>

time. This graph can be extrapolated for the scans obtained during the experiments in animals and optimize the scan time and with this the time that they are anesthetized.

Animals will be socially housed with a socially compatible animal. Additionally, animals are trained with positive reinforcement training to co-operate with injection of sedation and voluntarily enter the transport box.

During the study animals will be observed twice daily after the first day of the injection by qualified and competent animal caretakers. On the first day, after the injection, this observation will be more intensive, the first 4 hours after injection a veterinarian will be continuously in the same room to monitor the animals. Afterwards another rounds of observation will be around 6 and 8 hours post injection. Taking the turnover time of CSF of macaques into account it is expected that within 5 hours the balance within the brain is restored and with this the likelihood of acute side-effects. Nevertheless, cameras will be positioned into the stable to be able to monitor the macaques continuously. Should changes occur in behavior, appetite or stool then a veterinarian will be informed and appropriate measures will be implemented. On the basis of the scoring system a clinical human endpoint is defined (see section J). When this endpoint is (unexpectedly) reached, the animal will be immediately euthanized and a full necropsy will be performed to determine the cause of clinical disease. All procedures will be performed under sedation. On every time point where a procedure is performed the animal will be weighed and closely examined for clinical condition.

Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.4.1. Determining the optimal IT injection for 10.2.g in a healthy cynomolgus macaque model.: Citaat: Macaques to be used in this project might have been used in previous studies, provided that this did not had any influence on the normal anatomy and physiology of the brain or on related processes like atherosclerosis or diabetes. Given the long lifespan of this species, re-use will take place in the legal framework described in art. 1 of the law on animal testing.	

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1. Determining the optimal IT injection for 10.2.g in a healthy cynomolgus macaque model.	Nee	

Naam proef		
3.4.4.1. Determining the optimal IT injection for 10.2.g in a healthy cynomolgus macaque model.	HEP: <1%	Citaat: Based on the type of experiment a human endpoint is not expected. Though when neurological symptoms are observed (not expected based on the previous experiments but e.g. due meningitis or CSF leakage), directly the veterinarian will be consulted and appropriate action will be taken.
Java-apen (Macaca fascicularis)	Ongerief: 100,0% Matig	

5 Samenvatting

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

Voor het onderzoek zullen java apen worden gebruikt. Volgens de DEC is de keuze voor de diersoort voldoende onderbouwd. Het Secretariaat 11.1

Voor dit onderzoek kunnen dieren worden gebruikt die eerder zijn gebruikt voor andere studies. De gebruikte dieren kunnen tevens na dit onderzoek ook weer bestemd worden voor hergebruik. De DEC vindt hergebruik van de dieren mogelijk en wenselijk, gezien de lange levensduur van de apen. Het Secretariaat 11.1

De aanvrager geeft aan zich te willen beperken tot één geslacht, om de variatie zo klein mogelijk te houden. Dit heeft te maken met sekse-verschillen in de hoeveelheid CSF. Er is geen sprake van een fokoverschot. De DEC acht het gebruik van één geslacht voldoende onderbouwd. Het Secretariaat 11.1

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

Het Secretariaat 11.1

Het Secretariaat adviseert 11.1

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk november 2023 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.e en 10.2.g

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 10.2.g 202011789
Bijlagen
3

Datum 23 maart 2021

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Op 5 november 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Define optimal injection strategy of an antisense oligonucleotide (ASO) for Angelman Syndrome" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202011789. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 april 2021 tot en met 31 maart 2023. Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2024 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

Procedure

Datum:

23 maart 2021

Aanvraagnummer:

AVD10.2.g 202011789

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 10.2.g (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 19 februari 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 5 maart 2021 en 12 maart 2021 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het verhelderen van de motivatie voor het gebruik van dieren van 1 geslacht en voor het gebruik van gezonde dieren in plaats van een ziektemodel voor Angelman syndroom. Daarnaast zijn enkele teksten in de niet-technische samenvatting verduidelijkt. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

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

De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat door lange behandelingsduur van de aanvraag de beoogde startdatum reeds verstreken was.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d van de wet. Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2024 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar

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

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

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

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

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

Datum:
23 maart 2021
Aanvraagnummer:
AVD 10.2.g 202011789

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

i.o.

10.2.g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

10.2.g

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 april 2021 tot en met 31 maart 2023, voor het project "Define optimal injection strategy of an antisense oligonucleotide (ASO) for Angelman Syndrome" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202011789, na advies van dierexperimentencommissie 10.2.g . De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2.e . Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 5 november 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 19 februari 2021;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1. Determining the optimal IT injection for 10.2.g in a healthy cynomolgus macaque model., zoals ontvangen op 19 februari 2021;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 9 maart 2021;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 19 februari 2021
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 9 maart 2021, 16 maart 2021.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1. Determining the optimal IT injection for 10.2.g in a healthy cynomolgus macaque model.			
	Java-apen (Macaca fascicularis)	9	100,0% Matig

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2024 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Geldende voorschriften

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

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.

Aanvraagnummer: AVD10.2.g 202011789

- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD10.2.3 202011789

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD10.2.g 202011789

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

Levensloopdossier

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primate moet volgens artikel 15a van de wet een levensloopdossier bijgehouden worden.

Niet-menselijke primaten

De Minister heeft een ontheffing verleend volgens artikel 10e, zevende lid van de wet, die het gebruik van niet-menselijke primaten toestaat voor een periode van maximaal vijf jaar.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die

Aanvraagnummer:

AVD10.2.g 202011789

leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.

Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Bepalen van een optimale injectie strategie in de hersenen voor de behandeling van Angelman Syndroom
1.2 Looptijd van het project	01/04/2021 – 31/03/2023
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Angelman Syndroom, niet-humane primaten, PET-CTs

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Angelman Syndroom (AS) is een aangeboren genetische hersenaandoening die een ontwikkelingsachterstand veroorzaakt in combinatie met ernstige spraakstoornissen, een kleinere schedel en slaapstoornissen; vaak in combinatie met epilepsie. Er is geen specifieke behandeling beschikbaar. AS wordt veroorzaakt door een defect in een enzym (UBE3A) waardoor het niet goed functioneert. Het doel van dit onderzoek is om de functie van dit eiwit te herstellen door het toedienen in de hersenen van een specifieke teststof die dit enzym weer kan activeren. In apen wordt daartoe onderzocht welke injectietechniek een zo hoog mogelijke concentratie van deze stof, in het brein wordt verkregen. Deze studie, staat los van maar wordt uitgevoerd voorafgaand aan een studie op gezonde vrijwilligers. Voor de studie in gezonde vrijwilligers zal dezelfde injectiemethode gebruikt worden die in de
---	--

aap is gebruikt. Op deze manier kan er een koppeling tussen deze resultaten gemaakt worden.

- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Aan het einde van dit project is bekend met welke injectietechniek de hoogste concentratie van de teststof in het brein bereikt wordt. Met deze kennis zal de toediening voor de patiënt verbeterd kunnen worden, hoe hoger de concentratie van de teststof in het brein hoe groter de kans dat de patiënt baat bij de behandeling heeft. Met als gevolg dat de symptomen van AS af zullen nemen of zelfs helemaal verdwijnen.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- Voor dit onderzoek zullen 9 Java apen worden gebruikt.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
- De apen zullen ongerief ervaren door de injectie van de teststof. Bijwerkingen door de teststof worden niet verwacht omdat de dosis minimaal 5x lager is dan eerder getest. Bij die test werden alleen minimale effecten waargenomen. De injectie van de teststof zal wel voor een verhoogde druk in de hersenen zorgen en daarmee mogelijk hoofdpijn. Daarom zal de vloeistof zo langzaam mogelijk geïnjecteerd worden en worden bloeddruk en hartslag continue in de gaten gehouden.
- Daarnaast zullen de dieren stress ervaren van het transport naar een MRI en door de narcose gerelateerd aan de handelingen. Deze stress zal ook ervaren worden voor de keren dat de dieren onder narcose moeten voor het afnemen van bloed, hersenvloeistof en de PET-CTs. Om het aantal keren dat de dieren onder narcose moeten te minimaliseren zullen de laatste drie handelingen altijd samen worden uitgevoerd. Daarnaast zullen de dieren gevast worden voor de narcose om misselijkheid zoveel mogelijk te voorkomen.
- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?
- Het verwachte ongerief voor de dieren is matig.
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?
- Na afloop van het onderzoek zullen de dieren in leven blijven.

4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije
- Het doel is het vinden van de optimale injectietechniek van een teststof voor AS welke een zo hoog mogelijke concentratie van deze teststof in de hersenen oplevert. Dit kan niet gedaan worden met in vitro technieken omdat ook andere processen die van invloed zijn op de verdeling van de stof in de hersenen, zoals bloeddruk, hartslag en ademfrequentie nog niet goed na te bootsen zijn. Voor de vertaalbaarheid naar de mens is het belangrijk om een model te gebruiken dat qua opbouw, processen en genetische achtergrond zo

alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

dicht mogelijk bij de mens staat. Java apen worden vanwege hun grote overeenkomsten met de mens hierin veelvuldig voor dit type hersenonderzoek gebruikt. Knaagdieren of andere grote dierspecies, zoals de hond en het varken zijn in tegenstelling tot een Java aap, niet geschikt hiervoor door het kleine formaat en andere hersenopbouw (knaagdieren) of andere anatomie van het ruggenmerg en minder verwante hersenen in vergelijking met de mens. In de mens kan aanvullende informatie ingewonnen worden maar kan niet precies bepaald worden hoeveel van de test stof in het brein komt waardoor op dit moment onvoldoende informatie uit de mens verkregen kan worden.

De scan techniek (tijdschijven na injectie, scantijd) wordt van tevoren vastgesteld met behulp van een fantoom, een plastic buis, die het brein van de aap nabootst. Door deze te vullen met dezelfde radioactieve vloeistof die we voor de scans gebruiken kunnen we de scan nabootsen zonder aap.

4.2 Vermindering

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

Het aantal dieren zal zo laag mogelijk gehouden worden door de opzet van de studie optimaal te maken door data te gebruiken die verkregen is uit voorgaand onderzoek, de variatie binnen de dieren en groepen zo klein mogelijk te houden, door volume van ruggenmergvloeistof van tevoren te bepalen, dieren van één geslacht te gebruiken en naar de lichaamsbouw van de apen te kijken.

4.3 Verfijning

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

Vooraf vanwege de opbouw van de hersenen en de structuur van de verschillende onderdelen, is het brein van de Java aap bij uitstek geschikt omdat deze goed te vergelijken is met die van de mens. Daarnaast kan de verdeling van de teststof veranderen onder invloed van de hartslag en de ademfrequentie. Hiervoor is het dus van belang dat een diersoort wordt gebruikt waarbij dit vergelijkbaar is ten opzichte van de mens.

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

De Java apen worden sociaal gehuisvest met voldoende kooiverrijking. De procedures zullen zo goed mogelijk worden uitgevoerd met gestandaardiseerde handelingen, bevindingen om het welzijn te verhogen en ongerief te verminderen zullen direct worden toegepast. Narcose wordt gebruikt wanneer dit noodzakelijk is en ditzelfde geldt voor pijnstilling. Daarnaast zullen de Java apen humaan gedood worden wanneer ze (onverwacht) een humaan eindpunt bereiken voor het einde van de studie.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen