

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015270								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Mail aanvullende informatie 19-10-2015				x		x	x	
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x	

06 OKT. 2015



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10300/270
<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	

- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
--------------------------------	--

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
---	------------

KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9
------------	-----------------

- 1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10
----------------------	---------------------

Postbus	9101 [Redacted]
---------	-----------------

Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
--------------------	-----------------

IBAN	NL90ABNA0231209983
------	--------------------

Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud
---------------------------------------	----------------

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
-----------------------------	--

Functie	Postdoc
---------	---------

Afdeling	[Redacted]
----------	------------

Telefoonnummer	[Redacted]
----------------	------------

E-mailadres	[Redacted]
-------------	------------

- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
-----------------------------	---

Functie	
---------	--

Afdeling	
----------	--

Telefoonnummer	
----------------	--

E-mailadres	
-------------	--

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 . 1 0 . 2 0 1 5
- Einddatum 0 1 . 1 0 . 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Toepassing van nanodeeltjes in het gericht afleveren van medicijnen in het zieke orgaan
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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


6 Ondertekening


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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

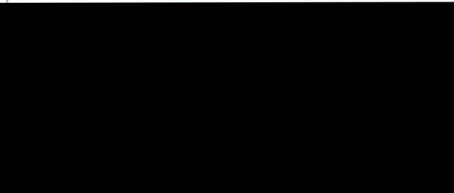
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 02 - 10 - 2015

Handtekening 



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of 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.zbo-ccd.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'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
<input type="checkbox"/> 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.

Specific drug delivery still faces major problems today. In particular, because of the systemic administration of most drugs, these drugs will reach many organs besides the organ that needs to be treated. This often leads to many unwanted side-effects in those organs. In addition, delivery of drugs across the cell membrane into the targeted cell is still very inefficient. Therefore, a major advance in drug delivery could be reached by delivering drugs specifically to the diseased cell-type or organ, and at the same time efficiently transporting the drug across the cell membrane (1). An example is the current treatment of patients with chronic kidney diseases, which affects approximately 10% of the global population. Treatment of these patients often occurs by immunosuppressive drugs, which have a beneficial effect on the kidney, but also result in the shutdown of the systemic immune defense and a reduced resistance to infections. Therefore, patients with chronic kidney disease would particularly benefit from a specific delivery of effective drugs to the affected part of the kidney. Obviously, development of drug delivery systems that specifically target other organ- or cell-types could enhance the treatment of many more patients with other organs or cell-type-specific diseases, including patients with alzheimer, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and vascular diseases.

Cell-penetrating peptides (CPP) form a group of peptides that are 8-30 amino acids in length that mostly contain several positively charged aminoacids, and have the capability to cross cellular membranes in a non-disruptive way and without apparent toxicity (2). The uptake mechanism of CPP into the cell can involve both direct translocation and endocytotic-mediated mechanisms, depending on the circumstances (3). CPP can take along cargoes such as small molecule drugs, oligonucleotides, proteins, liposomes and polymeric particles. These cargoes can either be conjugated by covalent bond formation or by non-covalent complexation. Because of these characteristics, CPP have been considered as a potentially promising drug delivery strategy for many years (4). However, their actual application has been hampered by a lack of information about the exact uptake mechanism of each cell penetrating peptide, about its in vivo distribution, and about its cell- or organ specificity. Interestingly, a recent study on the bio-distribution of ten different CPP has demonstrated that depending on the number of arginine residues present in the peptide, CPP can show a prominent distribution to either the kidney or the liver (5). The organ-specific distribution might also be related to their ability to bind specific sugars, including glycosaminoglycans, that are present on the surface of the targeted organ or cell-type (6).

We have previously discovered that a [REDACTED] acts as a CPP (7). [REDACTED] bodily fluids, and because of its endogenous origin we considered this an especially safe CPP. In a project funded by [REDACTED],

we have recently performed several in vivo experiments using [REDACTED] (see also DEC 2012-309). Following i.v. injection of fluorescently-labeled CPP in normal mice, we found that [REDACTED] distributed prominently to the kidney. In contrast, other organs including the liver, spleen, skin, brain and heart, exhibited at least a 5-fold lower distribution of the peptide. The distribution of the peptide in the kidney was particularly localized to the [REDACTED], also called the [REDACTED]. Importantly, these [REDACTED] are the main site of inflammation in many chronic kidney diseases. We found no short-term harmful effect of [REDACTED] CPP on mice in our experiments. For nona-arginine, a widely used CPP consisting of nine arginine residues, we did not observe a prominent enrichment in the kidney. All these data fit very nicely with in vitro experiments that showed a much better uptake of [REDACTED] CPP in mouse and human [REDACTED] (and [REDACTED]) cell lines that originate from [REDACTED] in the kidney, compared to other widely-used CPP. We have now obtained strong evidence that this celspecific activity is associated with a specific receptor present in these cells from the kidney. A manuscript describing these results is currently in preparation for publication.

To proceed to an application of CPP in drug delivery, we and others have demonstrated that CPP form nanoparticulate complexes with oligonucleotides, such as siRNA, antisense oligonucleotides and mRNA (8,9). In a follow-up project, that is also funded by [REDACTED], we have now shown that [REDACTED] CPP enhance the intracellular delivery and activity of antisense oligonucleotides in [REDACTED] cell lines. In this way, we were able to effectively suppress the expression of the [REDACTED] receptor in activated [REDACTED] in vitro. [REDACTED] has been considered an important potential target in the treatment of systemic or local inflammation, since it is involved in the binding of leukocytes to [REDACTED]. In addition, we have shown that we can deliver mRNA and effectively induce protein expression in [REDACTED], using [REDACTED]. We could also demonstrate that attachment of [REDACTED] to the bio-degradable polymer poly(lactic-co-glycolic acid (PLGA) (10), which normally shows a very inefficient cellular uptake, lead to an greatly enhanced uptake of PLGA particles in [REDACTED] cell lines. This offers another very interesting possibility, since PLGA particles are FDA approved and can be loaded with small-molecular drugs without the need for covalent coupling.

In conclusion, we have demonstrated that [REDACTED] CPP distribute to the [REDACTED] of the kidney, and can effectively deliver cargoes such as oligonucleotides and PLGA particles inside these cells. The next important step would be to show that [REDACTED] CPP-containing nanoparticles can actually be used in the treatment of kidney diseases, starting with the application in mouse models.

Moreover, our results open the door to look for CPP that target other disease-related cell-types or organs. We have previously found that different membrane components, including sugars, lipids and certain receptors, determine which CPP can enter a certain celltype (unpublished results and see also ref. 3, 6 and 7). Since each celltype has its own membrane 'signature', it should be possible to design CPP that target specific celltypes in organs besides the kidney. In addition, domains linked to cellpenetrating activity, for instance stretches of multiple arginines, can be combined with domains that bind specifically to cell- or organ-specific membrane-bound sugars, receptor or other membrane components, which combines cellpenetrating activity with celspecificity. Importantly, for [REDACTED] CPP, in vitro assays could predict the in vivo behaviour of the peptide. Therefore, we can use organ-specific cell lines to pre-screen novel designed peptides and select the 'specific' CPP for further tests in animals.

(1) Torchilin VP. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13:813-27.

(2) Foged C, Nielsen HM. Cell-penetrating peptides for drug delivery across membrane barriers. *Expert Opin Drug Deliv.* 2008;5:105-17.

(3) Brock R. The uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides: putting the puzzle together. *Bioconjug Chem.* 2014;25:863-8. doi: 10.1021/bc500017t.

- (4) Farkhani SM, Valizadeh A, Karami H, Mohammadi S, Sohrabi N, Badrzadeh F. Cell penetrating peptides: efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. *Peptides*. 2014;57:78-94.
- (5) Sarko D, Beijer B, Garcia Boy R, Nothelfer EM, Leotta K, Eisenhut M, Altmann A, Haberkorn U, Mier W. The pharmacokinetics of cell-penetrating peptides. *Mol Pharm*. 2010;7:2224-31. Cooper DL,
- (6) Favretto ME, Wallbrecher R, Schmidt S, van de Putte R, Brock R. Glycosaminoglycans in the cellular uptake of drug delivery vectors - bystanders or active players? *J Control Release*. 2014;180:81-90.

- (8) Boisguérin P, Deshayes S, Gait MJ, O'Donovan L, Godfrey C, Betts CA, Wood MJ, Lebleu B. Delivery of therapeutic oligonucleotides with cell penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015. pii: S0169-409X(15)00019-8.
- (9) van Asbeck AH, Beyerle A, McNeill H, Bovee-Geurts PH, Lindberg S, Verdurmen WP, Hällbrink M, Langel U, Heidenreich O, Brock R. Molecular parameters of siRNA--cell penetrating peptide nanocomplexes for efficient cellular delivery. *ACS Nano*. 2013;7:3797-807.
- (10) Mohamed F, van der Walle CF. Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties. *J Pharm Sci*. 2008;97:71-87.

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?

Our main goal is to develop a novel drug delivery strategy based on cell-penetrating peptides (CPP), which targets specific organs or cell-types and locally delivers drugs for therapeutical applications.

Based on our previous results with [REDACTED] CPP, we want now to proceed to the next step, and actually apply kidney-specific drug delivery using [REDACTED] CPP in the treatment of mouse models for kidney diseases. This is part of a recently started project that is funded by [REDACTED] and is performed in collaboration with the [REDACTED]. This project is also integrated in a long-term research line [REDACTED] which is investigating the application of cell-penetrating peptides. Our department has extensive experience with the preparation and characterization of nanoparticles made from CPP, oligonucleotides and/or PLGA nanoparticles. We will use the expertise from the [REDACTED] regarding mouse models for kidney diseases. In addition, the experiments will be performed by a [REDACTED]) that has worked at the [REDACTED] and has extensive experience with multiple mouse models for kidney diseases. He has also performed the bio-distribution studies of CPP in normal mice, as described in section 3.1. The mouse models that we will use are widely accepted in the literature as appropriate models for human kidney diseases and are currently operative in the [REDACTED]. Therefore, we think this part of the project will be feasible within the suggested time-frame.

Furthermore, we want to test novel in vitro developed CPP-containing nanoparticles that target other cell-types or organs and expand our promising results to the treatment of other diseases. We have established [REDACTED] CPP as a promising drug delivery system for kidney-specific targeting, as described in section 3.1, and are currently developing novel peptides and peptide-containing nanoparticles that could potentially target other cell-types or organs. [add basis for finding other peptides] Our department has extensive experience on the development of novel cell-penetrating peptides and nanoparticles for drug delivery, which has resulted in multiple publications in high-impact journals and approved patents (see also references 6 and 8 in section 3.1). Within this part of the project, we will test the bio-distribution in normal mice of novel developed CPP, either alone, in the form of nano-particulate complexes with oligonucleotides, or attached to nanoparticles. CPP/nanoparticles that show an organ or cell-type-specific distribution will be tested for their ability to effectively deliver oligonucleotides and small molecular drugs. Subsequently, we will contact a laboratory with experience in mouse models for diseases that affect the respective cell-type or organ, and form a collaboration to investigate the application of CPP-nanoparticles in the respective mouse models. Our experience with the development of [REDACTED] CPP as a novel drug delivery system for kidney-specific targeting, has shown that we can develop and apply novel CPP within the suggested time-frame of this project.

3.3 Relevance

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

Most drugs that are currently used to combat diseases are administered systemically to patients. Therefore these drugs often have their effect not only on their desired target cell or organ, but throughout the body. This leads to many side-effects, which has a significant impact on the quality of life for the patient and an important financial impact on the healthcare system. In addition, the delivery of the desired drug inside the target cells is in most cases very inefficient. Therefore, an effective and specific targeting of drugs to diseased cell-types or organs would be a major improvement for current drug delivery strategies. During the last decade, cell-penetrating peptides (CPP) have been considered one of the most promising strategies in resolving the delivery problem. However, since CPP can supposedly cross membranes of various cell types, their use for the specific targeting of drugs has been questionable. As described in section 3.1, we have recently demonstrated that [REDACTED] CPP distribute predominantly to [REDACTED] cells in the [REDACTED] of the kidney. In this way, we have proven that certain CPP are promising for the development of novel organ-targeted therapies, such as the kidney. In this project, we want to further demonstrate the great scientific potential of CPP-based drug delivery strategies, and we will start with the application for chronic kidney diseases.

Approximately 10% of the global population suffers from chronic kidney disease (6.7% in the Netherlands), which has significantly increased in the last decades. Chronic kidney diseases often target the [REDACTED] of the kidney, also called the [REDACTED] and lead to rapid and irreversible loss of renal function. This results in kidney replacement therapies such as dialysis or kidney transplantation for many of these patients. Besides a significant negative impact on the quality of life for these patients, these treatments have a huge financial impact on the healthcare system. Drugs that are currently used to combat chronic kidney disease, including immunosuppressive drugs, have many side effects in other parts of the body. Therefore, developing a method to specifically target existing or future drugs to the kidney, would be an enormous advance for current treatment strategies. Within this project, we want to demonstrate that [REDACTED] CPP can be used to specifically and effectively deliver drugs to the [REDACTED] of the kidney, and treat well-known mouse models for human kidney diseases. For this strategy we will use a CPP that are considered as non-toxic and immunologically safe, in combination with carriers such as PLGA that are FDA-approved, as well as drugs (for instance [REDACTED] antisense oligonucleotides, cyclosporin A) that are already clinically applied without specific targeting. Therefore, a future clinical development of our

strategy for patients with chronic kidney diseases would certainly be feasible. Subsequently, we hope to use our experience with the kidney-directed drug delivery, to develop and apply novel CPP that target other organs.

3.4 Research Strategy

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

As described in section 3.2, the main goals within this project are:

- (A) To apply kidney-specific drug delivery using [REDACTED] cell-penetrating peptides (CPP) in the treatment of mouse models for kidney diseases
- (B) To test novel in vitro developed CPP-containing nanoparticles that target other cell-types or organs and expand our results to the treatment of other diseases

To obtain these goals, the project will be divided into three parts:

- (1) Determining the bio-distribution of CPP in normal mice (only B)
- (2) Determining the effective/specific delivery of drugs using CPP in normal mice (A+B)
- (3) Application of drug delivery using CPP in the treatment of mouse models for human kidney diseases (only A) For [REDACTED] peptides (goal A), we have already performed the first part, in a previous DEC application (DEC 2012-309), and therefore we will only perform part 2 and 3. For goal B, we will only perform parts 1 and 2, since we do not know to which organ future CPP will distribute. In the future, we will then apply for an amendment or new application regarding the testing of novel CPP in diseased mouse models affecting the targeted organ.

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.

- (1) Determining the bio-distribution of cell-penetrating peptides (CPP) in normal mice

CPP will be selected based on in vitro assays, in which the uptake characteristics will be determined in cell lines representing different (organ-specific) celltypes. Uptake characteristics will be determined using techniques such as confocal microscopy and flow cytometry. Criteria for an appropriate CPP for in vivo use, will be: (1) a selective uptake in a limited number of celltypes; (2) the ability to effectively deliver nanoparticles and/or potential drug molecules such as oligonucleotides inside the cell; (3) no apparent toxic effects; and (4) stability in the presence of serum. that CPP that show promising results in in vitro assays in our laboratory, will be tested for their bio-distribution in mice. For this, CPP will be fluorescently labeled with Cy5.5, since the signal of the Cy5.5 label can penetrate enough through the tissue to visualize the organs. Normal mice will be injected and the bio-distribution of the fluorescently labeled CPP will be visualized in living mice using the In Vivo Imaging System (IVIS), that is already operational in [REDACTED]. Blood, urine and organs will be collected after the experiment to determine the amount of fluorescently labeled peptide that is present. Previous experiments in our lab using [REDACTED] CPP have shown that this method works very well to determine the bio-distribution of these peptides.

- (2) Determining effective and specific delivery of drugs using cell-penetrating peptides in normal mice

Eventually, CPP will be used to deliver cargoes inside specific cell-types, and these cargoes might affect the bio-distribution of the CPP. Therefore, CPP will be tested in combination with multiple cargoes, including CPP complexed with Cy5.5-labeled oligonucleotides, and CPP attached to Cy5.5 labeled nanoparticles. The bio-distribution of these complexes/nanoparticles will be analyzed in normal mice using the method described above in part 1. Here, the attached molecule, and not the CPP, will be labeled, since we previously found in our lab that the Cy5.5 label affects the binding of

the CPP to the oligonucleotide or nanoparticle. In this way we will know if the CPP can effectively deliver oligonucleotides (such as antisense oligonucleotides, mRNA or siRNA), which can later on be used for treatment, or nanoparticles, which can be filled with small molecular drugs. Preferably, the cargo will already include therapeutical molecules with a potential clinical application. For instance, we will use [REDACTED] CPP for the kidney-specific delivery of oligonucleotides and small molecular drugs, which have a high potential or are already used (in an non-targeted form) in the clinic for the treatment of chronic kidney diseases.

(3) Application of drug delivery using cell-penetrating peptides in the treatment of mouse models for human kidney diseases

To prove that cell-type or organ-specific drug delivery by CPP can actually be used for treatment, we will test CPP-containing oligonucleotide complexes or nanoparticles in relevant mouse models for human kidney diseases. For this, we will use [REDACTED] CPP that showed a specific distribution in the kidneys, in combination with drugs that have a high potential for future clinical application in the treatment of kidney diseases (as tested in part 2). We will choose established mouse models for different types of kidney diseases, and for which a specific delivery would be highly desirable. If necessary according to the literature, we will test the bio-distribution of labeled CPP-containing oligonucleotide complexes or nanoparticles in diseased mice, since kidney-specific distribution might be affected by the disease in some cases. For the treatment, we will use unlabeled CPP and unlabeled oligonucleotides/nanoparticles, since we previously found in in vitro experiments that the fluorescent label affects the treatment efficacy of the drug. Pre-diseased mice will be treated with the relevant CPP-containing oligonucleotide complexes or nanoparticles, and the effect of the treatment on disease development will be evaluated. Treatment and evaluation protocols will be performed according to methods described in the literature, and as much as possible in collaboration with the [REDACTED] that have experience using these mouse models. If necessary, a pilot experiment will be performed to determine to optimal dose for treatment for in the respective mouse model.

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

Flowchart (including go/no go points):

(1) In vitro selection of CPP: selective uptake in certain celltypes + effective delivery of nanoparticles/drugs + no toxic effects + good stability in the presence of serum?

—> no: use information for future design of CPP

—> yes: in vivo tests

—> In vitro selected CPP: specific bio-distribution?

—> no: use information for future design of CPP

—> yes: proceed to part 2

(2) CPP with specific distribution: effective delivery of cargo?

—> no: end (further in vitro optimization)

—> yes: proceed to part 3 (for targeting to other organs then the kidney: apply for amendment/new application)

(3) [REDACTED] CPP containing complexes or nanoparticles with an effective cargo delivery: treatment?

—> Disease affects organ-specific distribution?

—> yes: optimize treatment protocol/dose and repeat

- > no: proceed
- > Optimal dose for treatment?
 - > no optimal dose determined: repeat
 - > optimal dose determined: proceed
- > Treatment (compared to cargo-drug without CPP): significant beneficial effect?
 - > yes: final result!
 - > no: optimize treatment protocol and repeat experiment
 - > still no beneficial effect: end (consider other CPP/drug combinations)

As described in the scheme above, we will only evaluate in part 1 the distribution of multiple cell penetrating peptides (CPP) that show the most promising results in in vitro assays using the described criteria. Only CPP that show positive results in part 1, meaning that we observe a cell-type or organ-specific bio-distribution in normal mice, will proceed to part 2 of the project. Information from part 1 will be used to optimize the in vitro development of novel CPP. In part 2, we will test if the CPP also shows its specific bio-distribution in mice when its attached to a cargo such as oligonucleotides or nanoparticles. Only CPP that still show a specific distribution in combination with the respective cargo will proceed to part 3, otherwise we will look if we can adjust the CPP/cargo formulation and test it again. In part 3, we will actually test the treatment efficacy of CPP-containing nanoparticles. First, we will evaluate if a relevant diseased mouse model exists for the targeted organ. For this, we will search for a collaboration with a laboratory that has experience with the selected mouse model. Secondly, if we have indications from the literature, or our collaborators, that the bio-distribution of the CPP/nanoparticle might be affected by the disease, we will evaluate the bio-distribution of the CPP/nanoparticle in diseased mice. If we observe a different bio-distribution compared to healthy mice, we will try to use a different treatment protocol or dose. If that is not successful, we will end the experiment for this CPP/nanoparticle. Thirdly, we will test a range of different concentrations of CPP and its cargo (= drug) based on the literature, to determine the optimal dose for treatment. When the optimal dose is determined, a larger group of mice will be treated, to determine if a beneficial effect of the CPP-containing drug can be found compared to the drug without CPP. If we find no significant beneficial effect, meaning a more efficient treatment or less side-effects caused by the drug, we will try to optimize the treatment protocol and repeat the experiment. If we still find no beneficial experiment, we will stop the experiment with the respective CPP-containing drug and evaluate if we can use the CPP in combination with other relevant drugs.

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 bio-distribution of cell-penetrating peptides in normal mice
2	Determining the effective/specific delivery of drugs using cell-penetrating peptides in normal mice
3	Application of drug delivery using cell-penetrating peptides in the treatment of mouse models for human kidney diseases

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.zbo-ccd.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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Determining the bio-distribution of cell-penetrating peptides in normal mice

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The animal procedures for this part of the project will consist of a single injection of a fluorescently-labeled cell penetrating peptide (CPP). The outcome parameters will be the distribution of the peptide in normal mice as detected by the In Vitro Imaging System (IVIS) in which we aim for a prominent distribution to a specific organ. Data in the literature using other cell penetrating peptides show that approximately 90% of the tested CPP show a detectable distribution in (multiple) organs, with a low variation between the mice. We will collect urine and blood after the experiment, in which we will measure the concentration of fluorescently-labeled CPP. In addition, we will study by fluorescent correlation spectroscopy if the peptide is present in blood or urine in an intact form. In this way, we can determine the proteolysis of the peptide in the blood, and the excretion of the CPP in the urine within the time-frame of our experiment. Organs will be removed after the experiment to study the bio-distribution in the respective organ in more detail by histological analysis of tissue sections. We have previously shown for ██████████ CPP, that we can accurately estimate the behavior of the fluorescently-labeled CPP in normal mice using these outcome parameters. In addition, we found in these experiments that the outcome parameters were reproducible for the same CPP between different mice.

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

The bio-distribution will be studied by a single injection of fluorescently-labeled CPP into normal mice. The dose will be based on experiments that we have previously performed. The CPP will be labeled with Cy5.5, since the signal of the Cy5.5 (far-red) label has the ability to penetrate enough through the tissue to be visualized by the In Vitro Imaging System (IVIS). The IVIS is currently operative in ██████████, and has proven to be very effective in determining the in vivo distribution of Cy5.5 labeled molecules, in the literature and in our own experience. Since IVIS measurements will be performed on live animals, mice will be put under anesthesia to prevent movements during the imaging. In this way, we can visualize the distribution in the same mouse at one or more time-points (max. 3 time-points, max. duration of the total experiment is 6 hours). When mice will be analyzed at multiple timepoints, continuous anesthesia will be used during the whole experiment to reduce discomfort of the animals. Directly after the last imaging procedure, a drop of urine and blood will be collected. Blood and urine will be collected under anesthesia, to collect enough material for analysis. Subsequently, mice will be killed and the organs will be collected for further histological analysis.

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

To statistically determine the number of mice that we need to perform these experiments, we will perform a power calculation using data from the literature and our own data from previous experiments using ██████████ CPP. We have demonstrated in those experiments that the bio-

distribution is reproducible between individual mice, and we need only a minimal number of mice. In addition, the injection will be performed by experienced personnel from the animal facility, to prevent as much as possible experimental variation due to the injection.

B. The animals

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

For these experiments, we will use mice from EU-registered breeders. We will use mice, since these are the lowest animal possible that is suitable for bio-distribution studies using our method, and for which a large array of diseased animal models is available to determine treatment efficacy in future experiments. We expect to test each peptide in at least 3 mice, and test a total of approximately 25 different peptides within the time-frame of the project. In addition, we test the most promising peptides in female and male mice from different strains and at different ages (between 6 and 52 weeks) to exclude sex-, strain- or age-related effects on the bio-distribution. For this, we expect to use 75 more mice. Therefore, we expect to use in total a maximum of $(3 \times 25) + 75 = 150$ mice for the initial evaluation of the bio-distribution of CPP. Note that we use in vitro assays to extensively screen potential interesting CPP, and only CPP that demonstrate promising results, such as a specific uptake in certain cell lines, will be used for animal experiments.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mice	EU-registered breeder	150	6-52 weeks

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

Cell-penetrating peptides (CPP) will be tested extensively in in vitro assays for their characteristics and uptake in different murine and human cell lines. At this moment we cannot predict the behavior of CPP, or other molecules, in a complex organism, and therefore we are obliged to assess the bio-distribution of CPP in laboratory animals. We will use mice, since these are considered in the literature as the lowest animal species possible that still can reasonably predict the in vivo distribution in humans. Moreover, to determine the therapeutic potential of our targeted drug delivery strategy later on, we need a species of animal for which a broad range of animal models for human diseases are available. For many organs, including the kidney, mice are considered in the literature as the lowest animal species possible that still has a similar physiology compared to humans.

Reduction

Only the most promising CPP, that exhibit uptake in specific cell lines derived from human or mouse tissues, will be selected for in vivo testing. In this way, we will increase the change of success to find a organ-specific distribution in vivo. We will use data from previous experiments in our laboratory, as well as data from the literature, to optimize our experiment, which includes for instance the optimal dose and method of injection (i.v., i.p. etc.). In addition, a careful selection of the most appropriate CPP at this early stage will increase the change for success in more complicated experiments later on in this project. In the experimental procedure, the injection and IVIS analysis will be performed by experienced technicians or researchers, to reduce experimental variation caused by the injection, which will also results in a reduced number of mice needed for reproducible results.

Refinement

Mice will be exposed to as less discomfort as possible, which includes that the experimental procedures will be performed by experienced personnel. In addition, the IVIS measurements will be performed under anesthesia, to reduce the amount of stress due to constriction of the animal (since the animal is not allowed to move during the visualization).

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

Data from the literature regarding in vivo and in vitro experiments using CPP, suggest that we should not expect side-effects within the time-frame of our study (max. 6 hours). In addition, previous experiments in our laboratory using ██████████ CPP have shown no toxic side-effects in mice. We will use a dose that is based on these previous data. Nevertheless, animals will be closely monitored during the short time-span of the experiment for any discomfort. In addition, mice will be injected by qualified technicians since this is an essential part of the study. Discomfort due to

recovery from anesthesia (inhaling N20/O2/isoflurane) cannot be reduced since anesthesia is necessary for imaging the mice with the IVIS, and for the withdrawal of blood at the end of the experiment.

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.

n.v.t.

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.

Anesthetics will be applied via inhalation (for withdrawal of blood) at the end of the experiment by experienced personnel.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice can experience discomfort due to pain or stress. We do not expect any harmful effect caused by the injected CPP itself, also based on previous experiments that we performed.

Explain why these effects may emerge.

Adverse effects (pain, stress) on the mice can be caused by the injection, and later on by the recovery from the anesthesia. As already mentioned, we do not expect any adverse effects from the injected CPP. Based on the literature and our own experience, CPP have so far proven to be completely non-toxic, certainly within the time-frame of our experiment.

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

Mice will be injected by biotechnicians of the animal facility, with a lot of experience with animal procedures including injections. Moreover, mice will be closely monitored by the researcher during anesthesia and subsequent recovery.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Humane endpoints are related to possible clinical effects caused by injection of the CPP. However, CPP have proven to be non-toxic according to the literature and our own experience. Nevertheless, mice will be closely monitored for any signs of discomfort or pain. In addition, general criteria for application of a humane endpoints will apply as mentioned below:

- 1) The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment
- 2) The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the DEC
- 3) (reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment
- 4) The objective of the experiment has been reached

In case a mouse would reach one of the above mentioned humane endpoints, the mouse will be euthanatized.

Indicate the likely incidence.

Incidence < 0.1%, which is also based on previous experiments that we performed.

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).

mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

The animals need to be killed to obtain the organs for histological analysis of the in vivo distribution.

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

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.zbo-ccd.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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Determining the effective/specific delivery of drugs using cell-penetrating peptides in normal mice

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The animal procedures for this part of the project will consist of a single injection of fluorescently-labeled cell penetrating peptides (CPP) in complex with cargoes, such as oligonucleotides (siRNA, antisense oligonucleotides or mRNA) or nanoparticles (PLGA particles or other polymers). The outcome parameters will be the distribution of the fluorescently-labeled complex in normal mice as detected by the In Vitro Imaging System (IVIS), in which we aim for a prominent distribution to a specific organ. Data in the literature using other cell penetrating peptides show that approximately 90% of the tested CPP show a detectable distribution in (multiple) organs, with a low variation between the mice. We expect a similar probability for complexed CPP. In a part of the experiments, we will use either complexes of CPP with mRNA encoding for luciferase, or CPP-coated PLGA particles containing luciferase mRNA. In this way, effective delivery of luciferase mRNA in the target cell/organ will result in a subsequent expression of the luciferase protein. Luciferase can then be detected by either injecting the mice with luciferin, which is converted by the luciferase enzyme to light, by adding luciferin ex vivo to tissue homogenates, or by immunohistochemistry on tissue sections using anti-luciferase antibodies. In vitro experiments in our lab have shown that this method is a very effective way to detect an effective CPP-mediated delivery of a cargo into the target tissue or cell. We will collect urine and blood after the experiment, in which we will measure the concentration of fluorescently-labeled CPP-complex. In addition, we will study by fluorescent correlation spectroscopy if the complex is present in blood or urine in an intact form. In this way, we can determine the proteolysis of the complex in the blood, and the excretion of the complex in the urine within the time-frame of our experiment. Organs will be removed after the experiment to study the bio-distribution in the respective organ in more detail by histological analysis of tissue sections. We have previously shown for [REDACTED] CPP, that we can accurately estimate the behavior of the fluorescently-labeled CPP in normal mice using these outcome parameters. In addition, we found in these experiments that the outcome parameters were reproducible for the same CPP between different mice.

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

The bio-distribution will be studied by a single injection of fluorescently-labeled CPP-complexes into normal mice. The dose will be based on experiments that we have previously performed in our lab using complexed CPP, and will also be based on the peptide concentration that was used in part 1 of the project. In this case, the complexed molecule (oligonucleotides or nanoparticles) will be labeled with Cy5.5, since a label on the CPP interferes with complexation. This is not the case when the label is attached to the oligonucleotide or nanoparticle. The signal of the Cy5.5 (far-red) label has the ability to penetrate enough through the tissue to be visualized by the In Vitro Imaging System (IVIS). In some experiments, mice that were injected with complexes of CPP with mRNA encoding for luciferase, will be injected with luciferin shortly before analysis by the IVIS. Luciferase activity will be measured by the IVIS, which can detect the conversion of luciferin into (fluorescent) light. The IVIS is currently operative in [REDACTED], and has proven to be very effective in the literature and in our own experience for determining the in vivo distribution of

Cy5.5 labeled molecules. Since IVIS measurements will be performed on live animals, mice will be put under anesthesia to prevent movements during the imaging. In this way, we can visualize the distribution in the same mouse at one or more time-points (max. 3 time-points, max. duration of the total experiment is 6 hours). When multiple time-points are used, mice will be kept under continuous anesthesia to reduce discomfort. Directly after the last imaging procedure, a drop of urine and blood will be collected. Blood and urine will be collected under anesthesia, to collect enough material for future analysis. Subsequently, mice will be killed and the organs will be collected for histological analysis.

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

To statistically determine the number of mice that we need to perform these experiments, we will perform a power calculation using data from the literature, in addition to our own data using [REDACTED] CPP from previous experiments. We have demonstrate in those experiments that the bio-distribution is reproducible between individual mice, and we need only a minimal number of mice. In addition, the injection will be performed by experienced personnel from [REDACTED], to prevent as much as possible experimental variation due to the injection.

B. The animals

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

For these experiments, we will use mice from EU-registered breeders. We will use mice, since these are the lowest animal possible that is suitable for bio-distribution studies using our method, and for which a large array of diseased animal models is available that can be used to determine the treatment efficacy in future experiments. We expect test each CPP-complex in at least 3 mice, and test a total of approximately 10 different promising CPP (from part 1 of the project) in complex with 5 different oligonucleotides/nanoparticles within the time-frame of the project. In addition, we test the most promising CPP-complexes in female and male mice from different strains and at different ages (between 6 and 52 weeks) to exclude sex-, strain- or age-related effects on the bio-distribution. For this, we expect to use 50 more mice. Therefore, we expect to use in total a maximum of $(3 \times 10 \times 5) + 50 = 200$ mice for the initial evaluation of the bio-distribution of CPP-complexes. Note that we use in vitro assays to extensively screen potential interesting CPP, and only CPP that demonstrate promising results, such as a specific uptake in certain cell lines, will be used for animal experiments.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mice	EU-registered breeder	200	6-52 weeks

C. Re-use

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

Cell-penetrating peptides (CPP), in complex with oligonucleotides or nanoparticles, will be tested extensively in in vitro assays for their characteristics and uptake in different murine and human cell lines. Moreover, we have evaluated the bio-distribution of CPP in an earlier part of this project, and therefore we will only use CPP that showed a specific distribution in vivo. At this moment we cannot predict the behavior of CPP-complexes, or other molecules, in a complex organism, and therefore we are obliged to assess the bio-distribution of complexed CPP in laboratory animals. We will use mice, since these are considered in the literature as the lowest animal species possible that still can reasonably predict the in vivo distribution in humans. Moreover, we need an animal species for which a broad range of animal models for human diseases are available, to determine the therapeutical potential of our targeted drug delivery strategy later on. For many organs, including the kidney, mice are considered in the literature as the lowest animal species possible that still has a similar physiology of the organ compared to humans.

Reduction

Only the most promising CPP-complexes, based on previous assays, will be used for in vivo testing. In this way, we will increase the change of success to also find an organ-specific distribution in vivo. We will use data from previous experiments in our laboratory, as well as data from the literature, to start with the optimal experimental protocol. This will include for instance the optimal dose and method of injection (i.v., i.p. etc.). A careful selection of the most appropriate CPP-drug complex at this early stage will increase the change for success in experiments later on in this project. In the experimental procedure, the injection and IVIS analysis will be performed by experienced technicians or researchers, to reduce experimental variation caused by the injection. This will also result in a reduced number of mice needed for reproducible results.

Refinement

Mice will be exposed to as less discomfort as possible, which includes that the experimental procedures will be performed by experienced personnel. In addition, the IVIS measurements will be performed under anesthesia, to reduce the amount of stress due to constriction of the animal (since the animal is not allowed to move during the visualization).

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

Data from the literature regarding in vivo and in vitro experiments using penetrating peptides, suggest that we should not expect side effects within the time-frame of our study (max. 6 hours). Previous experiments in our laboratory using ██████████ CPP have also demonstrated that CPP exhibit no toxic side-effects in mice. Regarding the molecules used for complexation, we expect no side effects from the oligonucleotides, since these will consist of endogenous sequences. Based on the literature we also expect no adverse effects from the nanoparticles that will be used. We will primarily use PLGA-based nanoparticles, which is FDA-approved and has already been used in several clinical applications. We will determine the dose based on these published data. Nevertheless, animals will be closely monitored during the short time-span of the experiment for any discomfort. In addition, mice will be injected by qualified technicians since this is an essential part of the study. Discomfort due to recovery from anesthesia (inhaling N2O/O2/isoflurane) cannot be reduced since anesthesia is necessary for imaging the mice with the IVIS, and for the withdrawal of blood.

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.

n.v.t.

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.

F. Accommodation and care

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.

Anesthetics will be applied via inhalation (for withdrawal of blood) at the end of the experiment by experienced personnel.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Mice can experience discomfort due to pain or stress. We do not expect any harmful effect from the injected CPP-complex itself, also based on previous experiments that we performed.

Explain why these effects may emerge.

Adverse effects (pain, stress) on the mice can be caused by the injection, and later on by the recovery from the anesthesia. As already mentioned, we do not expect any adverse effects caused by the injected CPP, or cargo (oligonucleotides or PLGA), based on the literature and our own experience.

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

Mice will be injected by biotechnicians of the animal facility, with a lot of experience with animal procedures including injections. Moreover, mice will be closely monitored by the researcher during anesthesia and subsequent recovery.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Humane endpoints are related to possible clinical effects caused by injection of the CPP-complexes. However, based on our own experience and data from the literature, we do not expect any harmful effects. Nevertheless, the mice will be closely monitored for any signs of discomfort or pain. In addition, general criteria for application of a humane endpoints will apply as mentioned below:

- 1) The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment
- 2) The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the DEC
- 3) (reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment
- 4) The objective of the experiment has been reached

In case a mouse would reach one of the above mentioned humane endpoints, the mouse will be euthanatized.

Indicate the likely incidence.

Incidence < 0.1%, which is also based on previous experiments that we performed.

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).

mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

The animals need to be killed to obtain the organs for histological analysis of the in vivo delivery.

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

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.zbo-ccd.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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure Application of drug delivery using cell-penetrating peptides in the treatment of mouse models for human kidney diseases

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.

██████████ CPP, for which we have shown a selective targeting to the ██████████ in the kidneys, will be used for drug delivery in mouse models for human kidney diseases. In collaboration with the ██████████, well-established mouse models have been selected that represent different types of human kidney diseases. In particular, human kidney diseases for which a more effective and/or targeted therapy is necessary (for instance due to unwanted side effects of the respective drug). ██████████ has extensive experience with mouse models for the human diseases systemic lupus erythematosus (mouse model: MRL/lpr mice and (NZBxNZW)F1 mice, both genetic), diabetic nephropathy (mouse model: low-dose streptozotocin-induced), ██████████ (mouse model: LPS-induced) ██████████ (mouse model: Thy1.1 transgenic mice), focal ██████████ (FSGS) (mouse model: anti-GBM-induced), ischemic renal failure (mouse model: renal artery clamping), and kidney transplant rejection (mouse model: fetal heart transplantation). As a starting point, we will use mouse models that represent different types of human kidney diseases, but which induce at maximum a moderate amount of discomfort for the animals. In addition, we will design the experimental protocol in such a way, that the duration of the induced kidney disease will be as short as possible. The models that we will use will be MRL/lpr mice, low-dose streptozotocin-treated mice, LPS-treated mice and anti-██████████-treated mice. Regarding the treatment, we will select drugs that have great potential, or are already used, in clinical applications. The experiments will always start with a pilot experiment to determine the optimal dose, by injecting a range of different concentrations of the CPP-drug complexes in the mice. Subsequently, we will test the optimal dose in a larger experimental group. For this, experimental groups will consist of (1) untreated mice, (2) conventionally treated mice (without targeting to the kidneys), and (3) mice treated with CPP-drug complexes that are targeted to the affected organs. Treatment protocols will be set-up based on the literature and in collaboration with researchers of ██████████. We will start with the delivery of ██████████ antisense oligonucleotides, for which we already showed an effective delivery in ██████████ cells by ██████████ CPP. All mouse models, which are MRL/lpr mice, low-dose streptozotocin-treated mice, LPS-treated mice and anti-GBM-treated mice, will be followed during the experiment for signs of renal failure. This will occur by urinary analysis of protein leakage (proteinuria), determined by testing a drop of urine using albumin dipsticks. At the end of each experiment urine will be collected for measuring urinary levels of KIM-1 and N-GAL (damage markers), and albumin (protein leakage). In addition, creatinin levels will be determined in plasma, and kidneys will be collected for histological evaluation of kidney damage and the glomerular influx of granulocytes/leukocytes. These renal function markers are all well-established in the literature, and functional assays are currently operative in the lab of our collaborators. For MRL/lpr mice, we will also pay attention to signs of inflammation (in for instance the skin) and immune complex deposition in the kidneys, which has been described in the literature for these models. Outcome parameters has been determined for each mouse model based on the literature and the experience of the respective researchers. To test the effect of CPP-based drug therapy in MRL/lpr mice, low-dose streptozotocin-treated mice, LPS-treated mice and/or anti-██████████-treated mice, we will aim for a two-fold decrease in ██████████ influx of granulocytes. In addition, we will aim for a significant reduction of proteinuria (>50%) in all these animal models. For MRL/lpr mice we will also aim to reduce the amount of immune complex deposits in the kidney with 50% (determined by histological analysis).

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

MRL/lpr mice have a mutation in the fas gene, which results in the spontaneous development of a lupus-like disease starting at an age of approximately 10-weeks. Animals develop severe proteinuria and renal inflammation between 17 and 20 weeks. We will treat the mice with the therapeutical drug before onset of disease, and follow them up to an age of 17 weeks (before the development of severe disease). LPS-treated C57Bl/6 mice will receive a single intraperitoneal injection of LPS, which results in (relatively mild) inflammation. Mice are then treated with the therapeutical drug, and followed during 48 hours. We will choose a dose which has been shown to induce renal inflammation, but which does not induce severe side effects. Low-dose streptozotocin-treated mice will receive an intraperitoneal injection of streptozotocin for 5 days consecutively, according to an established protocol. Mice will be fasted for 4 hours prior to injection. Mice will be tested for hyperglycemia after 4 weeks, after which treatment with the therapeutical drug will be started. In case, mice have not developed hypoglycemia after 4 weeks, streptozotocin-treatment will be repeated after 7 weeks, after which the treatment with the therapeutical drug will start. Anti-██████ treated mice will receive a single intravenous injection of rabbit anti-mouse ██████ IgG, after which animals will be treated with the therapeutical drug. Mice will be followed up to 8 days post-injection.

Regarding the treatment, a pilot experiment will be performed for each model, in which we will determine the optimal dose by injecting a range of different concentrations of CPP-drug complexes in the mice. Subsequently, mice will be injected with the optimal dose in a follow-up experiment, in which the experimental groups will consist of (1) untreated mice, (2) conventionally treated mice (without targeting to the kidneys), and (3) mice treated with CPP-drug complexes that are targeted to the kidneys. Treatment protocols will be set-up based on the literature and in collaboration with researchers that have experience with the respective kidney disease mouse model, and will consist of a single or multiple injection(s) of CPP-drug complexes (either i.p. or i.v.).

Mice will be followed during the experiment for signs of the renal function as described in section A1. The experiment will be ended at a time-point indicate above, in which case we expect for each of the model that only moderate symptoms/discomfort will be occurring, unless the animal reaches a humane endpoint (see section J2). At the end of the experiment, mice will housed overnight in metabolic cages to collect the urine, unless a human endpoint is reached before this time-point. Furthermore, at the end of the experiment, or when a humane endpoint is reached, blood will be collected (under anesthesia), and mice will be killed to collect organs for histological analysis.

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

To statistically determine the number of mice that we need to perform these experiments, we will perform a power calculation using data from the literature and data delivered by our collaborators (who have experience with the respective kidney disease mouse model, as mentioned above). In our calculations, we will take along mice that might be lost from the experimental groups due to unexpected early development of disease symptoms. In addition, the injection will be performed by experienced personnel from ████████, to prevent as much as possible experimental variation due to the injection.

B. The animals

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

For these experiments, we will use mice from EU-registered breeders. Mice will be used, since this is the lowest animal species possible that has a similar kidney physiology to humans. In addition, for mice a large array of animal models for human kidney diseases is available to test treatment efficacy. Mice from different strains and at different ages will be used (between 6 and 52 weeks), depending on the selected kidney disease mouse model (as described in section A). The choice of our kidney mouse model, for application of our specific CPP-directed drug delivery, is based on the literature and in consultation with researchers that have extensive experience with the selected mouse models. We will use both male and female mice for the different models, except for the MRL/lpr and (NZBW)F1 mice since in these mice disease development occurs predominantly in the female mice (as is the case in the human disease). Therefore, we will use only female mice for these models. We expect to test the delivery of a maximum of 5 different drugs using the optimum delivery strategy as determined in vitro. For each drug delivery strategy, we will test a maximum of 3 appropriate kidney disease mouse models, either MRL/lpr mice, LPS-treated mice, low dose streptozotocin-treated mice, or anti-██████-treated mice. The of the model depends on the therapeutical drug we chose for kidney-specific delivery. We will determine the optimal dose for each treatment in a pilot experiment, for which we estimate to need a maximum of 100 mice. Based on the available experience with mouse models for chronic kidney diseases, we will be using treatment groups of approximately 10 mice. The exact number of mice will be determined for each mouse model using the appropriate statistical methods. We estimate that we will need a maximum of: 5 drug delivery strategies x 3 models x 10 mice x 3 groups (that is non-treated, conventional treatment and CPP-directed treatment) = 450 mice. To repeat some of the experiments, we expect to need a maximum of 200 extra mice. Therefore, in total we expect to need $100+450+200 = 750$ mice.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mice	EU-registered breeder	750	6-52 weeks

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

We will only use cell-penetrating peptides (CPP) that have shown a specific bio-distribution, and an effective delivery of cargo/drugs to the targeted organ, as determined in part 1 and 2 of this project. In this way, we will increase the chance of success when we apply these CPP for treatment in the respective mouse models. At this moment we cannot predict the behavior of complexed CPP, or other molecules, in a complex healthy organism, or during disease, and therefore we are obliged to assess the treatment potential of our CPP. We will use mice, since these are considered in the literature as the lowest animal species possible that still has a similar physiology of the kidneys compared to humans. Moreover, we need an animal species for which a broad range of animal models are available to determine the therapeutical potential of our targeted drug delivery strategy. The mouse models that we have chosen, represent well established models for different types of human kidney diseases. The experimental protocol for the selected models, we will be designed in such a way that the experiment will be terminated before mice develop severe signs the respective kidney disease.

Reduction

Only the most promising CPP-complexes will be used, which have shown a specific bio-distribution, and an effective delivery of cargo/drugs to the kidneys. We will use data from our previous experiments, as well as data from the literature, to start with the optimal treatment protocol, which includes for instance the optimal dose and method of injection (i.v., i.p. etc.). We also determine the optimal dose for our CPP-drug complex in a preliminary experiment. In addition, collaboration with researchers that already used the respective mouse models, will increase the chance of a successful experiment, and reduce the number of mice. In the experimental procedure, the injection will be performed by experienced technicians or researchers, to reduce experimental variation caused by the injection. This will also result in a reduced number of mice needed for reproducible results.

Refinement

Mice will be exposed to as less discomfort as possible, which includes that the experimental procedures will be performed by experienced personnel. In addition, treatment protocols will be designed in collaboration with qualified personal, to reduce discomfort due to the treatment. However, we cannot completely prevent discomfort, since we need to assess the therapeutically efficacy of our treatment in comparison with the non-targeted, and therefore non-ideal, treatment. The development of a specific drug-delivery strategy can also be considered as an effort to refine experiment, since a lower dose of the specifically targeted drug might be used in future experiment. This would result in less side-effects and less discomfort for the mice. Note that we will use biodegradable nanoparticles that have no negative environmental effect. Therefore, disease development for each mouse model will only be progressed until the appearance moderate signs of disease (mild proteinuria, no severe signs of systemic inflammation,

animals are still active), based on previous experiments. In addition, mice will be regularly screened for disease symptoms, also in collaboration with researchers that have experience with respective mouse models.

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

As already described in the animal procedures 1 and 2, we will use a concentration of CPP for which we expect no harmful effects based on the literature and on our own experience. The dose of the drugs that we will apply in combination with the respective CPP, will be chosen based on the literature and/or in collaboration with researchers who have already used this drug in kidney disease animal models. In addition, we will determine the dose of our CPP-drug complex in preliminary experiments. If available, we will select drugs for CPP-directed targeting to the kidneys, that have already been proven effective in the reduction of disease symptoms in mice and/or humans, but show a inefficient delivery or side-effects. In that way, we expect an improved efficacy of the selected drugs with reduced side-effects. We have chosen mouse models, which are the best available established mouse models for these kidney diseases. Importantly, we will design the experimental protocol in such a way that the selected animal models will experience discomfort that is moderate at maximum. For instance, MRL/lpr mice will only be followed until an age of 17 weeks, before onset of severe disease. LPS-treated mice will be followed up to 8 hours after the experiments, since this is a acute model, using a concentration of LPS which does induce severe side effects. For streptozotocin-treated mice, we will use a low dose that has been shown to induce diabetic kidney disease without severe side effects. The experimental protocol for anti-██████-treated mice is optimized for this batch of anti-██████ IgG, and does not lead to severe discomfort within the time frame of the experiment. Mice will be injected by qualified technicians, since this is an essential part of the study. In addition, mice will be closely monitored during the experiment for signs of disease development, which will take place in close collaboration with qualified personnel that has experience with respective mouse model. In experiments where mice have to be solitary housed in a metabolic cage, we will decrease stress by adding cage enrichment such as a nesting box.

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.

n.v.t.

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.

Anesthetics will be applied via inhalation (for withdrawal of blood) at the end of the experiment by experienced personnel.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice can experience discomfort due to pain or stress, and due to development of the disease that accompanies the selected mouse models. These include systemic inflammation (MRL/lpr mice, LPS-treated mice, and anti-██████ treated mice), hypoglycemia (streptozotocin-treated mice) and reduced renal function (all models). As mentioned earlier, the experimental protocol will be designed in such a way that the experiment will be terminated before onset of signs of severe discomfort. However, we cannot completely exclude the possibility that individual mice develop severe disease earlier as expected. In some experiments, mice will experience stress due to solitary housing. We do not expect any harmful effect from the injected CPP-complex itself, also based on previous experiments that we performed. In fact, our goal is to treat the mice and reduce disease symptoms.

Explain why these effects may emerge.

Adverse effects (pain, stress) on the mice can be caused by the injection, and later on by the recovery from anesthesia. In addition, in some experiments stress can be caused by solitary housing in metabolic cages. Adverse effects can also be caused by development disease symptoms, which include a decrease in renal function resulting in protein leakage in the urine, weight-loss, decreased activity, or inflammation of the kidney (and other organs in the case of a systemic inflammation). In the case of MRL/lpr mice, spontaneous development of lupus-like disease results in the deposition of immune complexes in the kidney. In anti-██████-treated mice, injection of anti-██████ results in binding of IgG in the kidney, resulting in local inflammation. LPS-treated mice develop a systemic inflammation by the injection of LPS, which on the short term leads (mostly) to renal inflammation. Streptozotocin-treated mice develop hypoglycemia, resulting in diabetes-like symptoms that include diabetic nephropathy with inflammatory reactions in the kidney. Note that we will ensure that the experimental protocols for the diseased mouse models that we use for therapeutic application of CPP-complexes, will ensure that have at maximum a moderate discomfort. As already mentioned, we do not expect any adverse effects caused by the injected CPP or therapeutic/cargo based on the literature and our own experience.

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

Mice will be injected by biotechnicians of the animal facility, who have much experience with animal procedures including injections. Moreover, mice will be closely monitored by the researcher during anesthesia and subsequent recovery. The experimental protocol will be designed in such a way that each mouse models will experience maximally a moderate discomfort during the experiment. In streptozotocin-treated mice, blood sugar levels will be checked and, if necessary mice will be supplied with 10% sucrose water. Renal function will be monitored regularly by testing a drop of urine

for leakage of albumin using albumin sticks. For mice that experience an albuminuria > 1 g/l, the experiment will be stopped. In addition, each experiment will be performed in close collaboration with personnel that has experience with the respective mouse model, and can help us to optimally design our experiment and according treatment protocol. Also note that our goal is to treat the diseased mouse and reduce discomfort due to diseased symptoms. If available, we will select drugs for CPP-directed targeting to the kidneys, that have already been proven effective in the reduction of disease symptoms in mice and/or humans, but showed side-effects or an inefficient delivery. In that way, we expect that we can use a lower dose because of the targeting and thereby reduce side-effects.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Humane endpoints are related to clinical effects caused by development of the kidney disease in the mice. Spontaneous, or induced development of kidney disease in mouse models leads to (moderate) signs of disease as described in section I). The main humane endpoint for all four mouse models will be severe proteinuria (> 1 g/l, as determined by testing a drop of urine using albumin dipsticks) over several days. In addition, apathetic behavior, decrease in eating/drinking or weight loss will be additional endpoints. For MRL/lpr mice, and LPS-treated mice, development of (severe) systemic inflammation (for instance in the skin or joints) will also be considered as an additional endpoint. In streptozotocin-treated mice, blood sugar levels will be checked in case of severe hypoglycemia over a long period, the experiment will be stopped. The researcher who performs the experiments has extensive experience with several of these mouse models, and the evaluation of renal function and discomfort of the mice due to disease symptoms. Importantly, the experimental protocol is designed to ensure that the selected kidney disease models will maximally experience a moderate discomfort. When any of the adapted criteria for humane endpoints are observed, or any of the general criteria for application of a humane endpoints mentioned below, mice will be euthanized. In this case, mice will not be housed in metabolic cages at the end of the experiment.

General criteria for application of a humane endpoints mentioned below:

- 1) The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment
- 2) The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the DEC
- 3) (reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment
- 4) The objective of the experiment has been reached

Indicate the likely incidence.

As mentioned above, the experimental protocol will be designed in such a way that severe disease symptoms (leading to a humane endpoint) should not develop, and mice will be killed before the onset of severe disease symptoms. However, since we can not completely exclude the appearance of

severe disease symptoms in individual mice, we expected an incidence of a humane endpoints (based on our own experience) of 20% (MRL/lpr), 20% (LPS-treated mice), 10% (streptozotocin-treated mice), and 15% (anti-██████-treated mice).

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).

mild (anesthesia, injection)
moderate (disease-related symptoms, metabolic cages)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

The animals need to be killed to obtain the organs for histological analysis of the development of the disease in non-treated and treated animals.

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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0034
2. Titel van het project: Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery.
3. Titel van de NTS: Toepassing van nanodeeltjes in het gericht afleveren van medicijnen in het zieke orgaan.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 27-03-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 13-04-2015
 - anderszins behandeld: herbespreking in DEC-vergadering op 02-06-2015
 - termijnonderbreking(en) van 20-04-2015 tot 21-05-2015 en van 28-07-2015 tot 28-08-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 21-05-2015 en 28-08-2015
 - advies aan CCD: 02-10-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 20-04-2015
 - Strekking van de vragen:
Niet-technische samenvatting:
 - Deze niet-technische samenvatting is te lang, mede door de vele herhalingen, en bevat een veelheid aan stijl- en spelfouten. De onderzoekers worden verzocht de lengte aan te passen conform de richtlijnen van de CCD en tevens op zinsbouw en spelling te letten.**Project Proposal:**
 - 1.3 en 3.1. In de titel wordt gesuggereerd dat de onderzochte peptides op eigen kracht de celwand penetreren, zonder actieve bijdrage hieraan van de betreffende cellen. Kunnen de

beschreven peptides werkelijk op eigen kracht de celwand penetreren, of is dit een endocytose-gemedieerd proces? De onderzoekers worden verzocht het proces van opname door de cel nader toe te lichten, en zondig de terminologie aan te passen.

-3.1. Op basis van welke bevindingen denken de onderzoekers dat er mogelijk peptides bestaan die specifiek worden opgenomen door endotheelcellen van andere organen dan wel specifiek ██████████ penetreren van andere organen? Zij worden verzocht dit beter toe te lichten.

-3.4 strategie B. Op grond van welke criteria selecteren de onderzoekers peptides om te testen in dierexperimenten? Indien er een in vitro stap vooraf gaat aan deze dierproeven, verzoekt de commissie de onderzoekers deze stap te beschrijven en nauwkeurig aan te geven op grond van welke criteria peptides geselecteerd zullen worden voor het bepalen van de bio-distributie in muizen. De commissie vindt het belangrijk dat deze afweging zorgvuldig gebeurt.

-3.4 strategie B. De beoogde diermodellen voor een humane ziekte zijn nog niet bekend, waardoor de DEC geen goede ethische afweging kan maken over dit deel van de projectaanvraag. Zij verzoekt de onderzoekers dan ook deze stap uit strategie B te verwijderen. Indien de onderzoekers te zijner tijd zullen kiezen voor een diermodel voor een specifieke humane ziekte, kunnen zij via een wijziging op deze projectaanvraag of een nieuwe projectaanvraag toestemming vragen voor dergelijke dierexperimenten. Zij worden verzocht deel 3 toe te spitsen op het nierziektemodel. Mits de selectie van peptides voldoende wordt onderbouwd, kunnen deel 1 en 2 wel uitgevoerd worden met nieuw te ontwikkelen peptides.

Description of Animal Procedures:

-Dierproef 1 en 2. A, tweede vraag. In het huidige experiment wordt de muis driemaal onder anesthesie gebracht binnen 6 uur. Waarom gebruiken de onderzoekers geen langdurige anesthesie waardoor het een terminaal experiment wordt met minder ongerief voor de dieren? Zij worden verzocht dit aan te passen dan wel toe te lichten waarom zij herhaalde anesthesie willen toepassen.

-Dierproef 3. De onderzoekers worden verzocht dit uitsluitend voor het nierziektemodel te beschrijven.

- Datum antwoord: 18-05-2015

Niet-technische samenvatting:

- Wij zijn ons bewust van de adviserende richtlijnen van de CCD betreffende de lengte van de niet-technische samenvatting (namelijk ongeveer 500 woorden, met uitzondering van de vragen). In het gewijzigde projectvoorstel hebben we daarom de lengte van de tekst ingekort van ongeveer 1500 naar 660 woorden. Verder bieden wij onze excuses aan voor enkele spel- en taalfouten in de niet-technische samenvatting, welke zijn gecorrigeerd in de gewijzigde aanvraag.

Project Proposal:

- 1.3 en 3.1- Wij begrijpen dat de commissie de term "celpenetrerende peptides" mogelijk verkeerd heeft geïnterpreteerd. Wij suggereren hiermee niet dat de peptides op eigen kracht de celmembraan passeren, en dat de cel hier geen actieve bijdrage aan levert. Sinds ongeveer 20 jaar wordt deze term binnen de wetenschappelijke wereld gebruikt voor peptides die de celmembraan makkelijk kunnen passeren en daarbij hun "vracht"

meenemen (waaronder RNA, DNA en eiwitten). Het mechanisme waarmee celpenetrerende peptiden de cel binnen dringen is de afgelopen tientallen jaren uitgebreid onderzocht. Onder andere de afdeling [REDACTED], heeft hierin een vooraanstaande rol gespeeld. Uit dit onderzoek is gebleken dat celpenetrerende peptiden zowel via directe translocatie als endocytose het celmembraan kunnen passeren. Dit is afhankelijk van het celpenetrerende peptide, maar ook van de concentratie van het peptide, het celtype en de getransporteerde vracht. Bovendien kan eenzelfde celpenetrerend peptide switchen tussen de verschillende mechanismen, afhankelijk van de omstandigheden. In beiden processen (directe translocatie en endocytose) spelen zowel het peptide als de cel een actieve rol. Dit gebeurt onder andere door binding aan specifieke suikers, vetzuren of eiwitten op het celmembraan (door het peptide), en het herrangschikken van moleculen in het celmembraan en/of rekrutering van signaal moleculen (door de cel). Meer informatie kunt u onder andere lezen in referentie 2 van onderdeel 3.1 van het projectvoorstel, of op Wikipedia (http://en.wikipedia.org/wiki/Cell-penetrating_peptide). Ter verduidelijking hebben wij in onderdeel 3.1 van het projectvoorstel de volgende zin toegevoegd: "The uptake mechanism of CPP into the cell can involve both direct translocation and endocytotic-mediated mechanisms, depending on the circumstances.". Verder hebben we een recent review artikel van [REDACTED] als referentie toegevoegd [REDACTED]

-3.1. Wij zijn het eens met de commissie dat het moeilijk te voorspellen is, of er peptiden bestaan die specifiek worden opgenomen door endotheelcellen (of andere celtypes) in andere organen. Aan de andere kant staan celpenetrerende peptiden juist bekend om het feit dat ze heel goed allerlei verschillende celtypes binnen kunnen gaan. Op dit moment wordt er echter weinig onderzoek gedaan naar de celspecificiteit, en het daarbij behorende opname mechanisme, van de verschillende celpenetrerend peptiden. Wel is er een vrij recente publicatie (Sarko et al., ref. #5 in onderdeel 3.1 van de gewijzigde aanvraag) die laat zien dat er een duidelijk verschil is in de biodistributie van een tiental bekende celpenetrerende peptiden naar de nieren en lever, maar ook milt, longen, hart en darmen. Verder weten we uit eigen onderzoek dat suikers aan de buitenkant van de cel, en de compositie van het membraan, bepalen of een bepaald celpenetrerend peptide wordt opgenomen in het desbetreffende celtype (o.a. beschreven in ref. 3, 6 en 7 in onderdeel 3.1 van de gewijzigde aanvraag). Dat heeft ons er oorspronkelijk toe gebracht om de celspecificiteit *in vitro* en *in vivo* nader te onderzoeken. Door verschillende celpenetrerende peptiden op orgaanspecifieke cellijnen te testen, hebben we gevonden dat celpenetrerende peptiden afgeleid van [REDACTED] uitermate geschikt zijn om nierspecifieke cellen (en dan vooral cellen uit het [REDACTED] te targeten. Deze resultaten hebben we vervolgens kunnen bevestigen in *in vivo* experimenten in muizen. Op dit moment zijn we het precieze opname mechanisme van deze peptiden aan het onderzoeken, maar het lijkt erop dat naast het celpenetrerende activiteit er ook een binding aan een specifieke receptor plaatsvindt. We weten uit eigen resultaten dat het specifieke opname mechanisme van een celpenetrerende peptide afhangt van zowel de karakteristieken van het peptide, als het celtype. Bovendien kunnen eiwitdomeinen die een celpenetrerende activiteit bevatten, zoals enkele dichtopeenvolgende arginines, makkelijk gecombineerd worden met een bekend

aminozuursequentie die bindt aan een cel- of orgaanspecifieke suiker of receptor. Daarom denken wij dat het mogelijk moet zijn om celpenetrerende peptiden te ontwikkelen die specifiek zijn voor andere celtypes of organen, naast het [REDACTED]. Wij hebben onderdeel 3.1 (Background) nu uitgebreid met deze informatie.

-3.4 strategie B. Uiteraard zullen wij een zorgvuldige afweging maken over welke celpenetrerende peptiden we uiteindelijk zullen gebruiken in dierexperimenten. Onze afdeling heeft een ruime ervaring in het ontwikkelen van nieuwe celpenetrerende peptiden en het testen in verschillende *in vitro* assays. Hierbij worden peptiden toegevoegd aan cellijnen afkomstig uit verschillende organen, en worden de opname eigenschappen bepaald m.b.v. confocale microscopie en flowcytometrie. Criteria voor een celpenetrerend peptide geschikt voor *in vivo* gebruik, zullen zijn: (1) een selectieve opname in een beperkt aantal celtypes; (2) capaciteit om effectief nanopartikels en/of potentiële medicijnmoleculen af te leveren; (3) geen zichtbaar toxisch effect; (4) en stabiliteit in aanwezigheid van serum. Zoals al eerder vermeld, hebben we de selectieve targeting van cellen in het [REDACTED] door [REDACTED] celpenetrerende peptiden, ook gevonden door verschillende celpenetrerende peptiden te testen op allerlei cellijnen. Het is belangrijk te vermelden dat de *in vitro* resultaten voorspellende waarden hadden voor de *in vivo* distributie van deze peptiden in muizen. We hebben de *in vitro* assays en bijbehorende criteria toegelicht in onderdeel 3.4 van de gewijzigde aanvraag.

-3.4 strategie B. Wij begrijpen dat het moeilijk is voor de DEC om een goede afweging te maken, wanneer de toekomstige diermodellen nog niet bekend zijn. Daarom hebben wij deze stap uit strategie B verwijderd, en onderdeel 3 toegespitst op muizenmodellen voor nierziekten. De zorgvuldige selectie van peptiden is verder onderbouwd in de gewijzigde aanvraag (zie ook antwoord bij de vorige opmerkingen).

Description of Animal Procedures:

-*Dierproef 1 en 2. A, tweede vraag.* Wij het protocol aangepast in de gewijzigde aanvraag, en zullen een langdurige anesthesie toepassen.

-*Dierproef 3.* Wij hebben dit onderdeel in de gewijzigde aanvraag uitsluitend gericht op de nierziektmodellen.

- Datum: 28-07-2015

Strekking van de vragen:

In bijlage 3 ontbreekt een concrete beschrijving van de diermodellen voor nierfalen die de onderzoekers willen gebruiken om hun nieuwe geneesmiddelafgifte systeem in te testen. Zij worden verzocht dit toe te voegen aan de aanvraag.

- Datum antwoord: 28-08-2015

Strekking van de antwoorden:

Naar aanleiding van uw commentaar hebben wij het onderdaal DAP-3 van onze aanvraag op een aantal punten gewijzigd. Hierbij is een meer gedetailleerde omschrijving van de diermodellen toegevoegd, inclusief aanvullende informatie over de benodigde handelingen, uitleesparameters en keuzecriteria. Onze excuses voor het ontbreken hiervan. Wij zijn het volledig met de DEC eens, dat deze informatie essentieel is om de aanvraag goed te kunnen beoordelen.

Verder hebben wij e.e.a. duidelijker opgeschreven, aangezien wij begrepen dat dit niet duidelijk was overgekomen bij de DEC. In de aanvraag hebben wij het over diermodellen

voor een zestal ziekten (bij mensen), waarvoor al ervaring bij de ██████████ bestaat. Wij hebben nu ook de desbetreffende diermodellen voor iedere humane ziekte toegevoegd. Verder noemen wij later dat we per behandeling drie modellen uitkiezen die het best geschikt zijn voor die behandeling. Waarmee we niet bedoelen dat we maar drie modellen in het totaal zullen gebruiken. Ook dit hebben we nu wat duidelijker proberen op te schrijven.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop a novel drug delivery strategy based on cell-penetrating peptides, which targets specific organs or cell-types and locally delivers drugs for therapeutical applications'. De te behalen onderzoeksresultaten zullen resulteren in de identificatie van celpenetrerende peptides die specifiek ophopen in bepaalde organen, en in de evaluatie van therapie op basis van celpenetrerende peptides die zorgen voor nierspecifieke medicijnafgifte in een nierziektemodel. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van nieuwe methoden om medicijnen gericht af te leveren in een doelorgaan waardoor patiënten mogelijk minder last van bijwerkingen van deze medicijnen zullen hebben.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring met de ontwikkeling van celpenetrerende peptides en biodistributie experimenten. Voor de proeven met diermodellen voor nierziekten wordt nauw samengewerkt met onderzoeksgroepen die hier veel ervaring mee hebben. De proeven volgen logisch op elkaar. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de ontwikkeling van nieuwe celpenetrerende peptides die specifiek ophopen in bepaalde organen van muizen, en het effect van therapie met celpenetrerende peptides die zorgen voor nierspecifieke medicijnafgifte in een nierziektemodel in muizen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is voor de meeste dieren realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor de muizen wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de injectie van celpenetrerende peptides en de inductie van een nierziekte met de daarop volgende behandeling. De DEC schat het ongerief als gevolg van de injecties met medicijnen of celpenetrerende peptiden (al dan niet gekoppeld aan medicijnen) en het kortdurend verblijf in een metabole kooi in als licht. Het ongerief als gevolg van het imageren onder anesthesie is minimaal. Het ongerief voor de dieren die een nierziekte ontwikkelen (dierproef 3) als gevolg van genetische aanleg, een injectie met LPS, meerdere injecties met streptozotocine of een injectie met anti-██████ antistoffen schat de commissie in als matig voor de meeste dieren (ongeveer 85% van de behandelde dieren). Een minderheid van de behandelde dieren (ongeveer 15%) zal ernstige ziekteverschijnselen ontwikkelen en een humaan eindpunt bereiken. De commissie schat het ongerief voor deze dieren in als ernstig, waarmee zij dus afwijkt van de beschreven inschatting van het ongerief in de aanvraag. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is volgens de DEC licht voor 30% van de muizen, matig voor 60% van de muizen en ernstig voor 10% van de muizen.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. Een deel van het project wordt in vitro uitgevoerd, voor het andere deel is onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. De biodistributie en afbraak van de celpenetrerende peptide-complexen kan alleen goed in vivo worden onderzocht, waarvoor dieren nodig zijn die qua fysiologie voldoende op mensen lijken. De onderzoekers kiezen voor muizen omdat er voldoende orgaanspecifieke ziektemodellen in dit dier zijn.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De verschillende dierexperimenten volgen logisch op elkaar, en resultaten uit eerdere experimenten worden gebruikt bij de opzet van daarop volgende experimenten. Door het inbouwen van go/no go momenten op basis van heldere criteria wordt voorkomen dat onnodige dierexperimenten worden uitgevoerd. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 1100 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. De biodistributie-experimenten vinden plaats onder terminale anesthesie, zodat de dieren geen ongerief ervaren door het ontwaken uit de anesthesie. De dieren waarbij een nierziekte wordt geïnduceerd worden regelmatig gecontroleerd op ziekteverschijnselen, en druppels van hun urine worden regelmatig onderzocht op ernstige proteïnurie. Op die manier kunnen zieke dieren in een vroeg stadium van nierziekte op humane wijze gedood worden om onnodig lijden van de dieren te voorkomen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke inzichten verkregen in het therapeutische effect van celpenetrerende peptide-complexen die zorgen voor nierspecifieke medicijnafgifte in nierziektomodellen bij muizen, en worden nieuwe celpenetrerende peptides geïdentificeerd die specifiek ophopen in bepaalde organen. Het is aannemelijk dat dit inzicht kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe methoden om medicijnen gericht in een doelorgaan af te leveren. Veel medicinale therapieën veroorzaken bijwerkingen doordat een systemisch toegediend medicijn niet alleen een effect heeft op het doelorgaan, maar ook op andere (niet aangedane) organen. Wanneer dergelijke medicijnen specifiek in het doelorgaan kunnen worden afgeleverd, zal de kans op bijwerkingen vanwege een effect in andere organen aanzienlijk afnemen. De DEC acht het belang van die doelstelling substantieel.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 60 % van de muizen matig ongerief en 10 % van de muizen ernstig ongerief zal ondervinden als gevolg van de nierziekte die eerst wordt geïnduceerd en vervolgens behandeld. Voor 30% van de muizen blijft het ongerief beperkt tot licht. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015270

Bijlagen

2

Datum 6 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015270. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101, ██████████
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: Postdoc
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 oktober 2015
Geplande einddatum: 1 oktober 2020
Titel project: Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery
Titel niet-technische samenvatting: Toepassing van nanodeeltjes in het gericht afleveren van medicijnen in het zieke orgaan
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies
- brief factuur

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Nijmegen

Datum:

2 oktober 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen



Postbus Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015270

Bijlagen

2

Datum 6 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 6 oktober 2015

Vervaldatum: 5 november 2015

Factuurnummer: 15700270

Ordernummer: kostenplaats en kostensoort: 040823-461220, CDL

projectnummer: 2015-0034, Verantwoordelijk onderzoeker: 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015270	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 19 oktober 2015 10:57
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: Aanvullende informatie aanvraag AVD103002015270

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte CCD,

Hieronder het antwoord van de onderzoeker op uw aanvullende vraag. De DAP is aangepast en stuur ik via net FTP.

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. In de bijlages dieproeven 1 en 2 heeft u geschreven beide geslachten te kunnen gebruiken. Kunt u toelichten of het mogelijk is in dierproef 3 dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

In dierproef 3 kunnen we muizen van beide geslachten voor de beschreven muizenmodellen gebruiken. Uitzondering zijn de muizenmodellen voor SLE (MRL/lpr model en (NZBW)F1 model), waarbij net als bij de humane ziekte, de ziektesymptomen voornamelijk bij de vrouwelijke muizen voorkomen. Hierdoor zullen wij voor deze modellen alleen vrouwelijke muizen gebruiken.

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: vrijdag 16 oktober 2015 14:48
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvullende informatie aanvraag AVD103002015270

Geachte [REDACTED]

Op 2 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery" met aanvraagnummer AVD103002015270. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden.

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. In de bijlages dieproeven 1 en 2 heeft u geschreven beide geslachten te kunnen gebruiken. Kunt u toelichten of het mogelijk is in dierproef 3 dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP of per post. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt indien u uw antwoord per post verstuurt.

Om u aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering te kunnen bespreken, ontvangen we graag uw antwoord uiterlijk dinsdag 20 oktober 2015.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

██████████

Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Tav. [REDACTED]

Postbus 9101
6500HB Nijmegen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015270

Uw referentie

Bijlagen

1

12 NOV. 2015

Datum

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 2 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery" met aanvraagnummer AVD103002015270. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 november 2015 tot en met 1 oktober 2020. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Op 19 oktober heeft u uw aanvraag aangevuld na vragen van de CCD.

Op 3 november 2015 heeft u een herziene bijlage dierproeven 3.4.4.3 en NTS gestuurd omdat de DEC het ongerief van de dieren hoger heeft geclassificeerd en de CCD deze classificatie heeft overgenomen.

Procedure

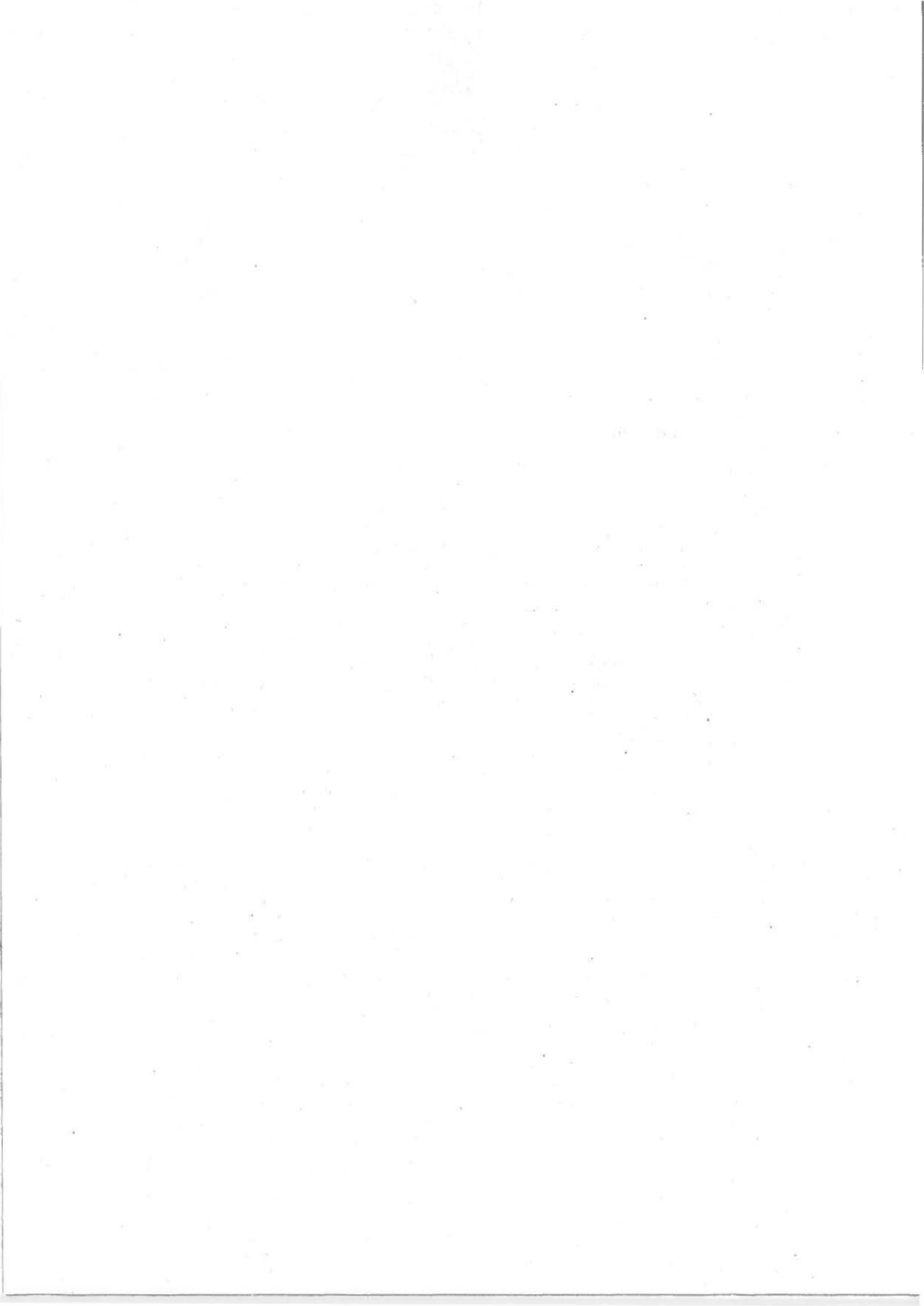
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 oktober 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. De CCD neemt in de vergunning een algemene voorwaarde op. Deze voorwaarde wordt gesteld bij langjarige projectvergunningen om te voldoen aan datgene wat voortkomt uit artikel 10 van de wet.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

Beoordeling achteraf

De CCD volgt het advies van de DEC om het ongerief van de dieren uit bijlage 3.4.4.3 te classificeren als matig (85%) en ernstig (15%). Door de ongerief classificatie ernstig is voor uw project een beoordeling achteraf vereist, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1d en lid 3 van de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.



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 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze gegevens in 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv. Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

- Hiervan deel uitmakend: - DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving





Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en woonplaats: 6500 HB Nijmegen
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 november 2015 tot en met 1 oktober 2020, voor het project "Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery" met aanvraagnummer AVD103002015270, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Postdoc. Voor de uitvoering van het project is de IvD verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 oktober 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 2 oktober 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 3 november 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 2 oktober 2015, ontvangen op 2 oktober 2015;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 19 oktober 2015 en 3 november 2015.

Dierproeven

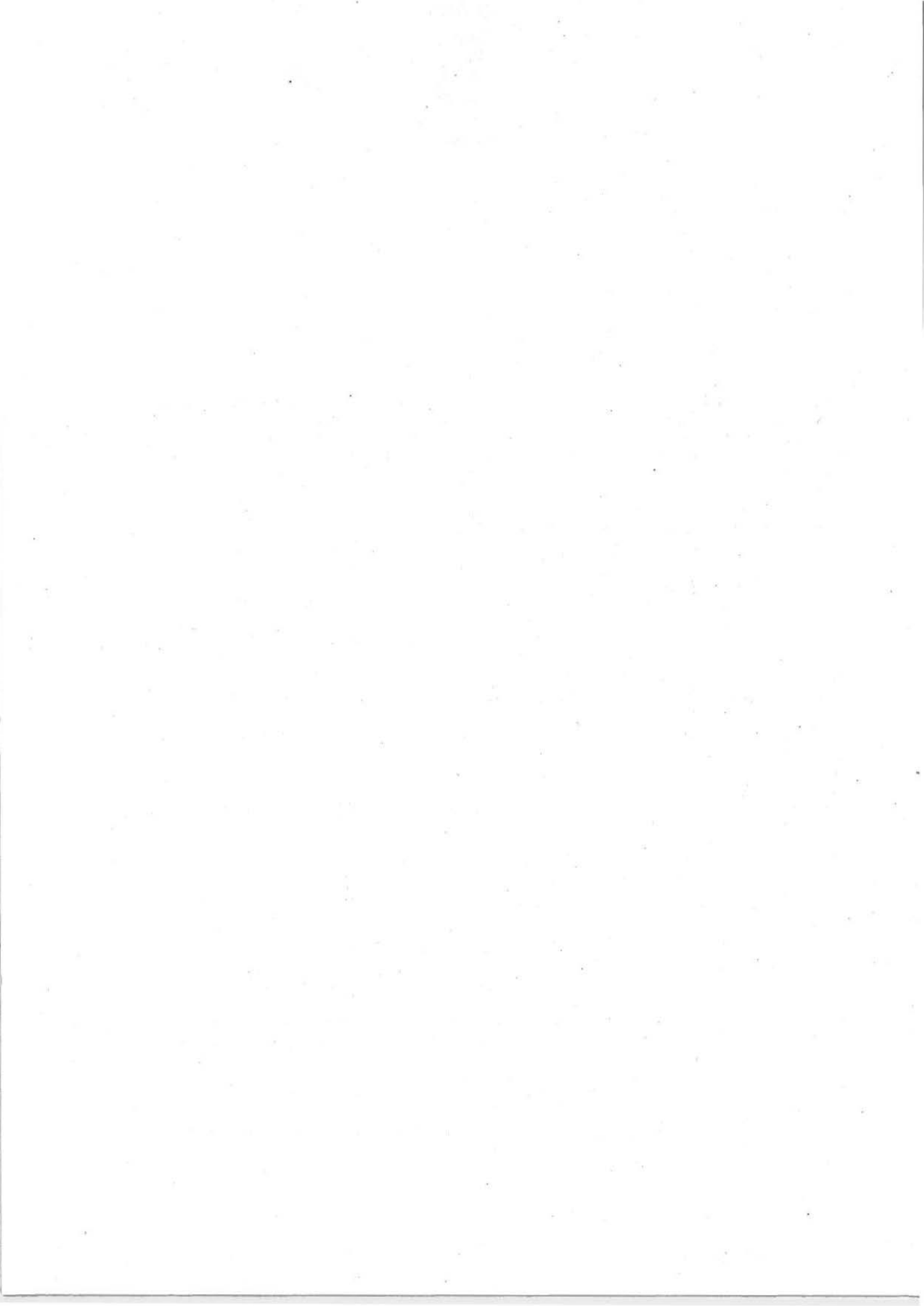
Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Determining the bio-distribution of cell-penetrating peptides in normal mice	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / beide geslachten; 6-52 weken oud; verschillende stammen	150	Licht/ Mild
Determining the effective/specific delivery of drugs using cell-penetrating peptides in normal mice	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / gelijk aan dierproef 1	200	Licht/ Mild
Application of drug delivery using cell-penetrating peptides in the treatment of mouse models for human kidney diseases	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / gelijk aan dierproef 1	750	85% Matig/ moderate 15% Ernstig/Severe

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd. Deze beoordeling zal uiterlijk 1 oktober 2021 plaatsvinden.

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen. De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go beslissingen worden genomen met instemming van de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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



Datum
12 november 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015270

kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.



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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft 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 van Economische Zaken 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 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 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 blijven schade



Datum
12 november 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015270

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van een beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2021 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.



DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0034
2. Titel van het project: Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery.
3. Titel van de NTS: Toepassing van nanodeeltjes in het gericht afleveren van medicijnen in het zieke orgaan.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 27-03-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 13-04-2015
 - anderszins behandeld: herbespreking in DEC-vergadering op 02-06-2015
 - termijnonderbreking(en) van 20-04-2015 tot 21-05-2015 en van 28-07-2015 tot 28-08-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 21-05-2015 en 28-08-2015
 - advies aan CCD: 02-10-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 20-04-2015
 - Strekking van de vragen:
Niet-technische samenvatting:
 - Deze niet-technische samenvatting is te lang, mede door de vele herhalingen, en bevat een veelheid aan stijl- en spelfouten. De onderzoekers worden verzocht de lengte aan te passen conform de richtlijnen van de CCD en tevens op zinsbouw en spelling te letten.
 - Project Proposal:**
 - 1.3 en 3.1. In de titel wordt gesuggereerd dat de onderzochte peptides op eigen kracht de celwand penetreren, zonder actieve bijdrage hieraan van de betreffende cellen. Kunnen de

beschreven peptides werkelijk op eigen kracht de celwand penetreren, of is dit een endocytose-gemedieerd proces? De onderzoekers worden verzocht het proces van opname door de cel nader toe te lichten, en zondig de terminologie aan te passen.

-3.1. Op basis van welke bevindingen denken de onderzoekers dat er mogelijk peptides bestaan die specifiek worden opgenomen door endotheelcellen van andere organen dan wel specifiek [REDACTED] penetreren van andere organen? Zij worden verzocht dit beter toe te lichten.

-3.4 strategie B. Op grond van welke criteria selecteren de onderzoekers peptides om te testen in dierexperimenten? Indien er een in vitro stap vooraf gaat aan deze dierproeven, verzoekt de commissie de onderzoekers deze stap te beschrijven en nauwkeurig aan te geven op grond van welke criteria peptides geselecteerd zullen worden voor het bepalen van de bio-distributie in muizen. De commissie vindt het belangrijk dat deze afweging zorgvuldig gebeurt.

-3.4 strategie B. De beoogde diermodellen voor een humane ziekte zijn nog niet bekend, waardoor de DEC geen goede ethische afweging kan maken over dit deel van de projectaanvraag. Zij verzoekt de onderzoekers dan ook deze stap uit strategie B te verwijderen. Indien de onderzoekers te zijner tijd zullen kiezen voor een diermodel voor een specifieke humane ziekte, kunnen zij via een wijziging op deze projectaanvraag of een nieuwe projectaanvraag toestemming vragen voor dergelijke dierexperimenten. Zij worden verzocht deel 3 toe te spitsen op het nierziekte-model. Mits de selectie van peptides voldoende wordt onderbouwd, kunnen deel 1 en 2 wel uitgevoerd worden met nieuw te ontwikkelen peptides.

Description of Animal Procedures:

-Dierproef 1 en 2. A, tweede vraag. In het huidige experiment wordt de muis driemaal onder anesthesie gebracht binnen 6 uur. Waarom gebruiken de onderzoekers geen langdurige anesthesie waardoor het een terminaal experiment wordt met minder ongerief voor de dieren? Zij worden verzocht dit aan te passen dan wel toe te lichten waarom zij herhaalde anesthesie willen toepassen.

-Dierproef 3. De onderzoekers worden verzocht dit uitsluitend voor het nierziekte-model te beschrijven.

- Datum antwoord: 18-05-2015

Niet-technische samenvatting:

- Wij zijn ons bewust van de adviserende richtlijnen van de CCD betreffende de lengte van de niet-technische samenvatting (namelijk ongeveer 500 woorden, met uitzondering van de vragen). In het gewijzigde projectvoorstel hebben we daarom de lengte van de tekst ingekort van ongeveer 1500 naar 660 woorden. Verder bieden wij onze excuses aan voor enkele spel- en taalfouten in de niet-technische samenvatting, welke zijn gecorrigeerd in de gewijzigde aanvraag.

Project Proposal:

- 1.3 en 3.1- Wij begrijpen dat de commissie de term "celpenetrerende peptiden" mogelijk verkeerd heeft geïnterpreteerd. Wij suggereren hiermee niet dat de peptiden op eigen kracht de celmembraan passeren, en dat de cel hier geen actieve bijdrage aan levert. Sinds ongeveer 20 jaar wordt deze term binnen de wetenschappelijke wereld gebruikt voor peptiden die de celmembraan makkelijk kunnen passeren en daarbij hun "vracht"

meenemen (waaronder RNA, DNA en eiwitten). Het mechanisme waarmee celpenetrerende peptiden de cel binnen dringen is de afgelopen tientallen jaren uitgebreid onderzocht. Onder andere de afdeling [REDACTED] heeft hierin een vooraanstaande rol gespeeld. Uit dit onderzoek is gebleken dat celpenetrerende peptiden zowel via directe translocatie als endocytose het celmembraan kunnen passeren. Dit is afhankelijk van het celpenetrerende peptide, maar ook van de concentratie van het peptide, het celtype en de getransporteerde vracht. Bovendien kan eenzelfde celpenetrerend peptide switchen tussen de verschillende mechanismen, afhankelijk van de omstandigheden. In beiden processen (directe translocatie en endocytose) spelen zowel het peptide als de cel een actieve rol. Dit gebeurt onder andere door binding aan specifieke suikers, vetzuren of eiwitten op het celmembraan (door het peptide), en het herrangschikken van moleculen in het celmembraan en/of rekrutering van signaal moleculen (door de cel). Meer informatie kunt u onder andere lezen in referentie 2 van onderdeel 3.1 van het projectvoorstel, of op Wikipedia (http://en.wikipedia.org/wiki/Cell-penetrating_peptide). Ter verduidelijking hebben wij in onderdeel 3.1 van het projectvoorstel de volgende zin toegevoegd: "The uptake mechanism of CPP into the cell can involve both direct translocation and endocytotic-mediated mechanisms, depending on the circumstances." Verder hebben we een recent review artikel van [REDACTED]

-3.1. Wij zijn het eens met de commissie dat het moeilijk te voorspellen is, of er peptiden bestaan die specifiek worden opgenomen door endotheelcellen (of andere celtypen) in andere organen. Aan de andere kant staan celpenetrerende peptiden juist bekend om het feit dat ze heel goed allerlei verschillende celtypen binnen kunnen gaan. Op dit moment wordt er echter weinig onderzoek gedaan naar de celspecificiteit, en het daarbij behorende opname mechanisme, van de verschillende celpenetrerend peptiden. Wel is er een vrij recente publicatie (Sarko et al., ref. #5 in onderdeel 3.1 van de gewijzigde aanvraag) die laat zien dat er een duidelijk verschil is in de biodistributie van een tiental bekende celpenetrerende peptiden naar de nieren en lever, maar ook milt, longen, hart en darmen. Verder weten we uit eigen onderzoek dat suikers aan de buitenkant van de cel, en de compositie van het membraan, bepalen of een bepaald celpenetrerend peptide wordt opgenomen in het desbetreffende celtype (o.a. beschreven in ref. 3, 6 en 7 in onderdeel 3.1 van de gewijzigde aanvraag). Dat heeft ons er oorspronkelijk toe gebracht om de celspecificiteit *in vitro* en *in vivo* nader te onderzoeken. Door verschillende celpenetrerende peptiden op orgaanspecifieke cellijnen te testen, hebben we gevonden dat celpenetrerende peptiden afgeleid van [REDACTED] uitermate geschikt zijn om nierspecifieke cellen (en dan vooral cellen uit het [REDACTED] te targeten. Deze resultaten hebben we vervolgens kunnen bevestigen in *in vivo* experimenten in muizen. Op dit moment zijn we het precieze opname mechanisme van deze peptiden aan het onderzoeken, maar het lijkt erop dat naast het celpenetrerende activiteit er ook een binding aan een specifieke receptor plaatsvindt. We weten uit eigen resultaten dat het specifieke opname mechanisme van een celpenetrerende peptide afhangt van zowel de karakteristieken van het peptide, als het celtype. Bovendien kunnen eiwitdomeinen die een celpenetrerende activiteit bevatten, zoals enkele dichtopeenvolgende arginines, makkelijk gecombineerd worden met een bekend

aminozuursequentie die bindt aan een cel- of orgaanspecifieke suiker of receptor. Daarom denken wij dat het mogelijk moet zijn om celpenetrerende peptiden te ontwikkelen die specifiek zijn voor andere celtypes of organen, naast het [REDACTED]. Wij hebben onderdeel 3.1 (Background) nu uitgebreid met deze informatie.

-3.4 strategie B. Uiteraard zullen wij een zorgvuldige afweging maken over welke celpenetrerende peptiden we uiteindelijk zullen gebruiken in dierexperimenten. Onze afdeling heeft een ruime ervaring in het ontwikkelen van nieuwe celpenetrerende peptiden en het testen in verschillende *in vitro* assays. Hierbij worden peptiden toegevoegd aan cellijnen afkomstig uit verschillende organen, en worden de opname eigenschappen bepaald m.b.v. confocale microscopie en flowcytometrie. Criteria voor een celpenetrerend peptide geschikt voor *in vivo* gebruik, zullen zijn: (1) een selectieve opname in een beperkt aantal celtypes; (2) capaciteit om effectief nanopartikels en/of potentiële medicijnmoleculen af te leveren; (3) geen zichtbaar toxisch effect; (4) en stabiliteit in aanwezigheid van serum. Zoals al eerder vermeld, hebben we de selectieve targeting van cellen in het [REDACTED] door [REDACTED] celpenetrerende peptiden, ook gevonden door verschillende celpenetrerende peptiden te testen op allerlei cellijnen. Het is belangrijk te vermelden dat de *in vitro* resultaten voorspellende waarden hadden voor de *in vivo* distributie van deze peptiden in muizen. We hebben de *in vitro* assays en bijbehorende criteria toegelicht in onderdeel 3.4 van de gewijzigde aanvraag.

-3.4 strategie B. Wij begrijpen dat het moeilijk is voor de DEC om een goede afweging te maken, wanneer de toekomstige diermodellen nog niet bekend zijn. Daarom hebben wij deze stap uit strategie B verwijderd, en onderdeel 3 toegespitst op muizenmodellen voor nierziekten. De zorgvuldige selectie van peptiden is verder onderbouwd in de gewijzigde aanvraag (zie ook antwoord bij de vorige opmerkingen).

Description of Animal Procedures:

-*Dierproef 1 en 2. A, tweede vraag.* Wij het protocol aangepast in de gewijzigde aanvraag, en zullen een langdurige anesthesie toepassen.

-*Dierproef 3.* Wij hebben dit onderdeel in de gewijzigde aanvraag uitsluitend gericht op de nierziektmodellen.

- Datum: 28-07-2015

Strekking van de vragen:

In bijlage 3 ontbreekt een concrete beschrijving van de diermodellen voor nierfalen die de onderzoekers willen gebruiken om hun nieuwe geneesmiddelfgifte systeem in te testen. Zij worden verzocht dit toe te voegen aan de aanvraag.

- Datum antwoord: 28-08-2015

Strekking van de antwoorden:

Naar aanleiding van uw commentaar hebben wij het onderdaal DAP-3 van onze aanvraag op een aantal punten gewijzigd. Hierbij is een meer gedetailleerde omschrijving van de diermodellen toegevoegd, inclusief aanvullende informatie over de benodigde handelingen, uitleesparameters en keuzecriteria. Onze excuses voor het ontbreken hiervan. Wij zijn het volledig met de DEC eens, dat deze informatie essentieel is om de aanvraag goed te kunnen beoordelen.

Verder hebben wij e.e.a. duidelijker opgeschreven, aangezien wij begrepen dat dit niet duidelijk was overgekomen bij de DEC. In de aanvraag hebben wij het over diermodellen

voor een zestal ziekten (bij mensen), waarvoor al ervaring bij de afdeling [REDACTED] bestaat. Wij hebben nu ook de desbetreffende diermodellen voor iedere humane ziekte toegevoegd. Verder noemen wij later dat we per behandeling drie modellen uitkiezen die het best geschikt zijn voor die behandeling. Waarmee we niet bedoelen dat we maar drie modellen in het totaal zullen gebruiken. Ook dit hebben we nu wat duidelijker proberen op te schrijven.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop a novel drug delivery strategy based on cell-penetrating peptides, which targets specific organs or cell-types and locally delivers drugs for therapeutical applications'. De te behalen onderzoeksresultaten zullen resulteren in de identificatie van celpenetrerende peptides die specifiek ophopen in bepaalde organen, en in de evaluatie van therapie op basis van celpenetrerende peptides die zorgen voor nierspecifieke medicijnafgifte in een nierziektemodel. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van nieuwe methoden om medicijnen gericht af te leveren in een doelorgaan waardoor patiënten mogelijk minder last van bijwerkingen van deze medicijnen zullen hebben.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring met de ontwikkeling van celpenetrerende peptides en biodistributie experimenten. Voor de proeven met diermodellen voor nierziekten wordt nauw samengewerkt met onderzoeksgroepen die hier veel ervaring mee hebben. De proeven volgen logisch op elkaar. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de ontwikkeling van nieuwe celpenetrerende peptides die specifiek ophopen in bepaalde organen van muizen, en het effect van therapie met celpenetrerende peptides die zorgen voor nierspecifieke medicijnafgifte in een nierziektemodel in muizen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is voor de meeste dieren realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor de muizen wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de injectie van celpenetrerende peptides en de inductie van een nierziekte met de daarop volgende behandeling. De DEC schat het ongerief als gevolg van de injecties met medicijnen of celpenetrerende peptiden (al dan niet gekoppeld aan medicijnen) en het kortdurend verblijf in een metabole kooi in als licht. Het ongerief als gevolg van het imagen onder anesthesie is terminaal. Het ongerief voor de dieren die een nierziekte ontwikkelen (dierproef 3) als gevolg van genetische aanleg, een injectie met LPS, meerdere injecties met streptozotocine of een injectie met anti- antistoffen schat de commissie in als matig voor de meeste dieren (ongeveer 85% van de behandelde dieren). Een minderheid van de behandelde dieren (ongeveer 15%) zal ernstige ziekteverschijnselen ontwikkelen en een humaan eindpunt bereiken. De commissie schat het ongerief voor deze dieren in als ernstig, waarmee zij dus afwijkt van de beschreven inschatting van het ongerief in de aanvraag. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is volgens de DEC licht voor 30% van de muizen, matig voor 60% van de muizen en ernstig voor 10% van de muizen.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. Een deel van het project wordt in vitro uitgevoerd, voor het andere deel is onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. De biodistributie en afbraak van de celpenetrerende peptide-complexen kan alleen goed in vivo worden onderzocht, waarvoor dieren nodig zijn die qua fysiologie voldoende op mensen lijken. De onderzoekers kiezen voor muizen omdat er voldoende orgaanspecifieke ziektemodellen in dit dier zijn.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De verschillende dierexperimenten volgen logisch op elkaar, en resultaten uit eerdere experimenten worden gebruikt bij de opzet van daarop volgende experimenten. Door het inbouwen van go/no go momenten op basis van heldere criteria wordt voorkomen dat onnodige dierexperimenten worden uitgevoerd. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 1100 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. De biodistributie-experimenten vinden plaats onder terminale anesthesie, zodat de dieren geen ongerief ervaren door het ontwaken uit de anesthesie. De dieren waarbij een nierziekte wordt geïnduceerd worden regelmatig gecontroleerd op ziekteverschijnselen, en druppels van hun urine worden regelmatig onderzocht op ernstige proteïnurie. Op die manier kunnen zieke dieren in een vroeg stadium van nierziekte op humane wijze gedood worden om onnodig lijden van de dieren te voorkomen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke inzichten verkregen in het therapeutische effect van celpenetrerende peptide-complexen die zorgen voor nier specifieke medicijnafgifte in nierziektedmodellen bij muizen, en worden nieuwe celpenetrerende peptides geïdentificeerd die specifiek ophopen in bepaalde organen. Het is aannemelijk dat dit inzicht kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe methoden om medicijnen gericht in een doelorgaan af te leveren. Veel medicinale therapieën veroorzaken bijwerkingen doordat een systemisch toegediend medicijn niet alleen een effect heeft op het doelorgaan, maar ook op andere (niet aangedane) organen. Wanneer dergelijke medicijnen specifiek in het doelorgaan kunnen worden afgeleverd, zal de kans op bijwerkingen vanwege een effect in andere organen aanzienlijk afnemen. De DEC acht het belang van die doelstelling substantieel.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 60 % van de muizen matig ongerief en 10 % van de muizen ernstig ongerief zal ondervinden als gevolg van de nierziekte die eerst wordt geïnduceerd en vervolgens behandeld. Voor 30% van de muizen blijft het ongerief beperkt tot licht. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - o 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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

