

		Inventaris Wob-verzoek W17-09								
			wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.		document NTS 20171164	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Aanvraagformulier				x		x	x	
2		NTS			x					
3		NTS aangepast	x							
4		Projectvoorstel				x			x	
5		Bijlage animal procedure 1			x					
6		Bijlage animal procedure 2			x					
7		Bijlage animal procedure aangepast			x					
8		Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x	
9		DEC advies				x		x	x	
10		Mail verzoek en antwoord aanvullende informatie				x		x	x	
11		Advies CCD		x						x
12		Beschikking en vergunning				x		x	x	

24 MAART 2017



Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.
- ☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 90700
☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen
- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- Naam instelling of organisatie InnoSer Laboratories
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [REDACTED]
KvK-nummer 61886890
Straat en huisnummer Zernikedreef 9
Postbus [REDACTED]
Postcode en plaats 2333 CK Leiden
IBAN NL224BNA0581547756
Tenaamstelling van het rekeningnummer [REDACTED]
- 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.
- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.
- (Titel) Naam en voorletters [REDACTED]
Functie [REDACTED]
Afdeling [REDACTED]
Telefoonnummer [REDACTED]
E-mailadres [REDACTED]
- ☒ Dhr. ☐ Mw.
- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
- (Titel) Naam en voorletters [REDACTED]
Functie [REDACTED]
Afdeling [REDACTED]
Telefoonnummer [REDACTED]
E-mailadres [REDACTED]
- ☐ Dhr. ☐ Mw.

- 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 _____
 Functie _____
 Afdeling _____
 Telefoonnummer _____
 E-mailadres _____
- ☐ Dhr. ☐ Mw.
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- ☐ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
☒ Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 4 - 2017
 Einddatum 31 - 3 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van de ziekte van Hurler.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Rug/UMCG
 Postadres _____
 E-mailadres secrdec.umcg@umcg.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege
☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. ☐ Via een eenmalige incasso
☐ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van de ziekte van Hurler.
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Biodistributie, kinetiek, Hurler

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Het doel van dit project is om te testen of onze, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen de juiste cellen in de organen van het lichaam bereiken en of er positieve effecten zijn bij muizen die de ziekte van Hurler hebben. Onze teststoffen, oligonucleotiden, richten zich specifiek op de verandering van het RNA, RNA is de voorloper van vele andere eiwitten en enzymen. Bij de ziekte van Hurler, is het Mucopolysaccharidose I (MPS I) aangetast (Clarke et al, 2002), het wordt veroorzaakt door veranderingen in DNA van een enzym (Idua). Dit enzym speelt een belangrijke rol bij de afbraak van glycosaminoglycanen (GAGs) in de vetcellen. Bij het syndroom van Hurler stapelen GAG's zich uiteindelijk op in de cellen, waardoor mensen onder andere last hebben van achterlijkheid, botafwijkingen, groeiachterstand, blindheid, hartafwijkingen, slaapproblemen en longstoornissen. Voor het ontwikkelen van nieuwe medicijnen tegen deze ernstige ziekte willen we graag oligonucleotiden testen. Ons oligonucleotidenplatform richt zich specifiek op de verandering van het RNA en met als doel het herstel van de productie/functie van het IDUA enzym en daarmee uiteindelijk het herstellen van de ziekte van Hurler.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Het doel van het huidige project is om antwoord te geven op de vraag of onze oligonucleotiden positieve effecten laat zien in het Hurler muis model, dat doen we door het bepalen van de: verdeling en de effecten van onze teststoffen in zowel een wildtype model, als een ziektemodel. Naar aanleiding van de uitkomsten van deze experimenten kunnen we de medicijnen verder het ontwikkelingstraject in helpen en daarmee een bijdrage leveren in de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen de ziekte van Hurler.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	1760 muizen in totaal: 800 wildtype muizen 960 Hurler muizen
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Het welzijn van de dieren wordt aangetast door het feit dat de dieren stoffen krijgen toegediend via verschillende toedieningstechnieken, ook wordt er bloed afgenomen. Waar noodzakelijk wordt ongerief zoveel mogelijk beperkt door anesthesie toe te passen.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	100% van de dieren wordt vooraf ingedeeld als matig.

- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?
- Dood in de proef

4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.
- Proefdiervrije alternatieven kunnen helaas niet worden gebruikt omdat we de gegevens nodig hebben om verder het ontwikkeltraject te komen. Het gehele en intacte dier is noodzakelijk om de effecten van verdeling in het lichaam (de zogenaamde: absorptie, distributie, metabolisme en excretie) in de dieren kaart te brengen. Alle teststoffen worden van tevoren in diverse studies met cellen van patiënten en celmateriaal van het Hurler muis model getest op effectiviteit, toxiciteit en immunogeniciteit.
- 4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.
- Er worden altijd het maximale aantal dieren gebruikt dat nodig is om een uitspraak te kunnen doen over de lichaamsverdeling van de betreffende stof. We geven maximaal 40 op per experiment, maar zullen waarschijnlijk per stof met minder dieren toe kunnen. De uiteindelijke aantallen zijn nodig om meerdere formuleringen en injectietechnieken toe te kunnen passen.
- Iedere wijziging zal worden afgestemd met de IVD alvorens de proef uit te breiden.
- 4.3 **Verfijning**
Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.
- De muis is bij uitstek geschikt, de muis is klein en eenvoudig te huisvesten en te hanteren. Daarnaast is er jarenlange ervaring met de muis, en er is een relevant ziektemodel (Hurler) beschikbaar, waarmee de vertaalbaarheid naar de mens vergroot wordt.
- Vermeld welke algemene maatregelen genomen
- Het welzijn van de dieren wordt zorgvuldig gemonitord, de dieren krijgen voldoende water, voer, beddingmateriaal en kooiverrijking. Bovendien worden de dieren gehanteerd door ervaren personen en (indien noodzakelijk) wordt anesthesie

worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

toegepast. We hopen hiermee de negatieve gevolgen voor de muis zoveel mogelijk te beperken en toch goede resultaten te verkrijgen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 90700 |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | InnoSer Laboratories BV |
| 1.3 | Vul de titel van het project in. | Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom. |

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

☐ Fundamenteel onderzoek

☒ Translationeel of toegepast onderzoek

☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie

☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier

☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort

☐ Hoger onderwijs of opleiding

☐ Forensisch onderzoek

☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

De aanleiding voor dit project is de vraag naar gegevens met betrekking tot de effecten van nieuwe therapeutische stoffen (oligonucleotiden) in een ziektemodel. Deze oligonucleotiden richten zich specifiek op de modulatie van het RNA, RNA is de voorloper van vele moleculen in het lichaam, onder andere eiwitten en enzymen.

Bij genetische ziekten, onder andere Mucopolysaccharidose I (MPS I) ook bekend als het Hurler syndroom (Clarke et al, 2002). Het Hurler syndroom is relatief zeldzaam (1:100.000) en is de meest ernstige vorm van de MPS I subtypes. Het Hurler syndroom is een autosomale recessieve ziekte welke wordt veroorzaakt door mutaties in DNA van het enzym alpha-L-iduronidase (Idua). In deze aanvraag richten wij ons hier op de meest voorkomende mutatie van het Hurler syndroom I (30-45% van de Hurler patiënten) namelijk de p.Trp402X mutatie. Dit is een nonsense mutatie dat leidt tot een premature stopcodon, de zogenaamde p.Trp 402X mutatie (G→A substitutie, TGG→TAG) (Scott et al, 1992, Hein et al, 2004) en hierdoor komt het Idua eiwit niet tot expressie. Het Idua eiwit speelt een essentiële rol bij de afbraak van de glycosaminoglycanen (GAGs), welke in het geval van ontbreken van Idua kunnen accumuleren in de cellen. Symptomen van de ziekten zijn o.a. mentale retardatie, botafwijkingen en groeiachterstand, blindheid, cardiomyopathie, slaapapneu en longfunctiestoornissen.

Het doel van ons oligonucleotidenplatform is om een van nature voorkomend RNA-editing mechanisme in de cellen te gebruiken om heel specifiek en doelgericht nucleotiden in het RNA aan te passen. [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] We denken hiermee de expressie (en dus functie) van Idua te herstellen en hiermee de onderliggende oorzaak van de ziekte van Hurler aan te pakken.

De chemische modificaties van de oligonucleotiden welke gebruikt zullen worden voor deze RNA-editing benadering zijn al in diverse klinische studies succesvol getest (voornamelijk exon skipping en niet RNA editing) en veilig bevonden na systemische en lokale (oog, CNS, long en spier) toediening.

Clarke LA. Mucopolysaccharidosis Type I. 2002 Oct 31 [Updated 2016 Feb 11]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1162/>
Scott, H. S., Litjens, T., Hopwood, J. J., & Morris, C. P. (1992). A common mutation for mucopolysaccharidosis type I associated with a severe Hurler syndrome phenotype. *Human Mutation*, 1(2), 103–108. <http://doi.org/10.1002/humu.1380010204>
Hein, L. K., Bawden, M., Muller, V. J., Sillence, D., Hopwood, J. J., & Brooks, D. A. (2004). α -L-iduronidase premature stop codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients. *Journal of Molecular Biology*, 338(3), 453–462. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.012>
Han, L., Diao, L., Yu, S., Xu, X., Li, J., Zhang, R., ... Liang, H. (2015). The Genomic Landscape and Clinical Relevance of A-to-I RNA Editing in Human Cancers. *Cancer Cell*, 28(4), 515–528. <http://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.08.013>
Hein, L. K., Bawden, M., Muller, V. J., Sillence, D., Hopwood, J. J., & Brooks, D. A. (2004). α -L-iduronidase premature stop codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients. *Journal of Molecular Biology*, 338(3), 453–462. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.012>

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van het huidige project is om antwoord te geven op de vraag of onze testcompound positieve effecten laat zien in het Hurler muis model specifiek voor de p.Trp402X mutatie (Wang et al., 2010; Wang et al., 2012).

De studies in muizen zijn essentieel voor het bepalen van de: biodistributie, farmacokinetiek en daarmee de effectieve dosering van onze teststoffen voor verder klinisch onderzoek in Hurler patiënten.

De studies zijn haalbaar omdat we beschikken over de juiste capaciteiten, er is een geschikt laboratorium (AAALAC geaccrediteerd), al ons personeel voldoet aan de geldende wet en regelgeving en we zorgen dat we continu getraind worden. De verschillende (deel)studies zijn qua aantallen goed uit te voeren en haalbaar binnen de grenzen van dit project.

Wang D, Belakhov V, Kandasamy J, Baasov T, Li SC, Li YT, et al. The designer aminoglycoside NB84 significantly reduces glycosaminoglycan accumulation associated with MPS I-H in the Idua-W392X mouse. Mol Genet Metab. 2012;105(1):116–25.

Wang D, Shukla C, Liu X, Schoeb TR, Clarke LA, Bedwell DM, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. Mol Genet Metab. 2010 Jan;99(1):62–71.

3.3 Belang

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

Maatschappelijk bestaat er vraag naar de ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor de ziekte van Hurler, het gaat om 1:100.000 geboren kinderen met zeer ernstige afwijkingen, een lage kwaliteit van leven en een beperkte levensverwachting.

Momenteel zijn er twee behandelmethodeën: stamcel therapieën, of toediening van het zuivere enzym (Idua). Stamceltherapie is echter niet zonder gevaren en wordt mede daarom niet vaak uitgevoerd. Het enzym zal na systemische toediening niet de hersenen bereiken omdat **het eiwit te groot is om de bloed-hersen barrière te passeren** en zal voor de meeste patiënten daarom een beperkt effect hebben.

Deze twee redenen zijn aanleiding om het huidige onderzoek te starten en op zoek te gaan naar een betere behandeling, een die niet afhankelijk is van het passeren van de bloed-hersen barrière, maar om de expressie van Idua te herstellen op RNA niveau. [REDACTED]

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het project beoogt in dit stadium antwoord te geven op de vraag in welke doseringsvorm, dosis, frequentie/regime en in welke tijdsperiode de grootste effecten van onze teststof worden gezien.

We zoeken in de aanvraag bepaalde vrijheidsgraden omdat we op zoek zijn naar de beste toedieningswijze/toedieningsgraad van ons nieuwe product. In vitro weten we dat deze techniek werkt en hebben we een aantal kandidaat stoffen gevonden. De translatie naar in vivo is essentieel omdat de distributie en opnamen van oligonucleotiden in vivo anders zijn dan in vitro. In vitro wordt vaak een transfectie reagent gebruikt, in vivo kunnen we die niet gebruiken door hun hoge mate van toxiciteit, daarom willen we onderzoeken wat in vivo de beste toedieningswijze is. Daarbij starten we basaal: zien we een verschil in lokale of systemische toediening? Zien we een verschil tussen verschillende formuleringen? Ook hierbij is het noodzakelijk dat we hier onderzoek kunnen doen teneinde ons product verder te ontwikkelen. Het kan voorkomen dat we bijvoorbeeld een

goed werkend product hebben waarbij we willen bestuderen of een slow-release formulering uiteindelijk lokaal/of systemisch (dat willen we onderzoeken) nog betere effecten laat zien. Het weloverwogen traject ontwikkelt zich tijdens de medicijnontwikkeling, niet iedere stap wordt van tevoren uitgeschreven, er is geen wet van meden en perzen. In aanvulling hierop, om uiteindelijk een product geregistreerd te krijgen is het verkrijgen van deze data essentieel. De EMA geeft aan dat er geen consistentie is in het veld, echter wel dat het noodzakelijk informatie op kan leveren voor de rest van het dossier.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002771.pdf).

(0) De effectiviteit en toxiciteit van de teststoffen wordt altijd eerst *in vitro* getest voordat er naar bio distributie gekeken wordt. Daarvoor worden o.a. patiënten cellen, maar ook embryonale stamcellen van de Idua-W392X muis (met een mutatie analoog aan de *p.Trp402X* mutatie in mensen, zie Wang et al, 2010/2012 hierboven) gebruikt, deze data is beschikbaar, maar vertrouwelijk.

(1) Daarna wordt de biodistributie en opname van fluorescent-gelabelde teststoffen bepaald in wildtype muizen; (2) vervolgens kijken we naar de biodistributie in ons Hurler model.

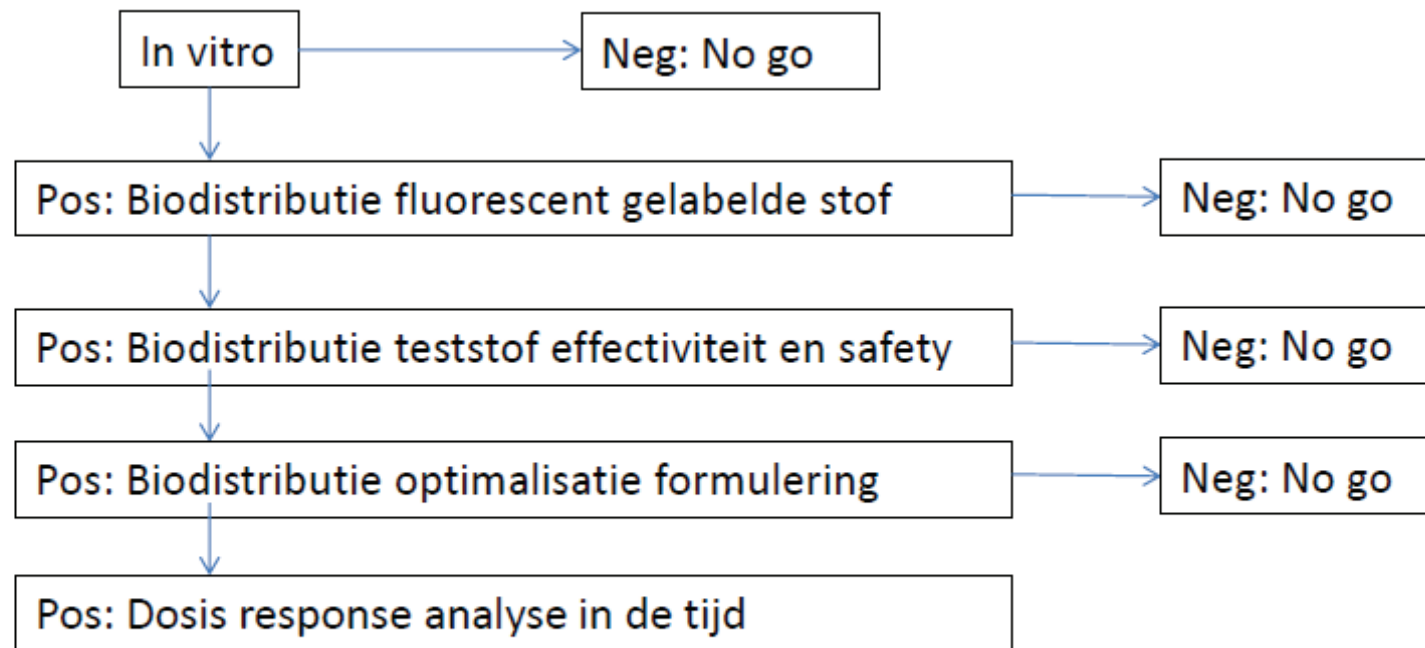
(3) Eerst worden de effecten van een enkele hoge dosering van onze teststof waarbij we op verschillende tijdstippen muizen opofferen; (4) vervolgens kijken we of we een dose-response curve kunnen maken op het optimale tijdpunt na dosering en aansluitend willen we meten wat het effect is van herhaalde doseringen.

Er is een flowdiagram bijgevoegd als pdf aan de protocollen.

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

Het project bestaat uit een viertal studies binnen het project beogen om uit alle geteste methoden de beste methode te destilleren die we kunnen gaan gebruiken in de verder ontwikkeling van het huidige oligonucleotide model. Zie hiervoor het flowdiagram:

1. -Biodistributie in wildtype muizen met fluorescent gelabelde stof;
 2. -Biodistributie/kinetiek en safety in Hurler muizen;
 3. -Biodistributie optimalisatie formulering;
 4. -Dosis-respons optimalisatie in de tijd.
-



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

Er wordt onderzoek gedaan naar de biodistributie en effectiviteit van dezelfde nieuwe oligonucleotide teststoffen voor Hurler. De biodistributie zal worden bestudeerd door middel van histologie: detectie van fluorescent-gelabelde teststoffen, in-situ hybridisatie – en analytische methodes zoals HPLC. De effectiviteit zal worden bepaald in weefsels d.m.v. moleculaire en biochemische assays zoals digital droplet PCR, next-generation

sequencing en Western Blot. Daarnaast zal de enzymatische activiteit van Idua ex vivo worden bepaald. Ten slotte zal d.m.v. histologische analyse van diverse organen de opstapeling van GAGs worden bepaald.

In principe zal de samenhang grotendeels als volgt zijn:

Voor deze studies wordt er eerst in diverse in vitro studies gekeken naar de effectiviteit van de teststoffen in cellijnen van patiënten en embryonale fibroblasten van de Idua-W392X muis. Vervolgens zal ook gekeken worden naar toxiciteit en immunogeniciteit (in vitro) van deze teststoffen.

1. Als eerste wordt bepaald welke toedieningsmethode en formulering zich het beste leent voor de ontwikkeling. We starten hierbij eerst met een studie met een fluorescent-gelabelde teststof waarbij we in wildtype muizen de stof kunnen lokaliseren na toediening. Indien we de stof niet kunnen lokaliseren zullen we niet verder gaan, dit is een duidelijke no-go;
2. Ten tweede zullen we in de Idua-W392X muis een enkele relatief hoge, maar veilige, dosering testen waarbij we diverse weefsels zoals lever, hersenen, nieren, oog (retina) op verschillende tijdstippen willen isoleren om te kijken op welk tijdstip na dosering de effectiviteit het hoogste is en of er sprake is van een 'wash-out' van het effect periode en of er sprake is van een safety risico. Aan de hand van deze resultaten zullen we vaststellen of er een optimaal tijdstip is na doseren. Er is gekozen voor deze weefsels, want daar is de expressie van de ADAR enzymen het hoogst en zijn belangrijke doelwitorganen bij Hurler.
3. Ten derde zullen we op het optimale tijdstip de formuleringen optimaliseren, dan bekijken we of dezelfde, of liever een lagere concentratie in een ander vehicle of een andere toedieningstechniek betere effecten laat zien.
4. Ten vierde zullen we een meervoudige dosis-response relatie vastleggen, meerdere doseringen variërend in de tijd, om zo te kijken of de effecten vergoten of wat het maximale effect van de test stoffen is.

Bovengenoemde experimenten worden verdeeld in twee typen dierproef:

- 1) Studies met Wildtype muizen; deze worden gebruikt voor bio distributie en als positieve controle (aanwezigheid en functie Idua);
- 2) Studies met Hurler muizen (Idua-W392X muis).

Voor het beantwoorden van de vraag of onze testcompound positieve effecten laat zien in het Hurler muis model, hebben we de Hurler muis nodig. Vooraf vinden wij het essentieel om te weten of onze stof bij de beoogde organen komt. We meten daarbij de fluorescentie in een fluorescente muis. Indien we lokaal geen effecten zien op fluorescentie dan hoeven we geen experiment uit te voeren met het Hurler muis model. Omdat dit laatste model in potentie een hogere kans op ongerief heeft hebben we deze route gekozen. Hiermee doen we relatief meer studies

met het fluorescente model en minder met het Hurler model. De eerste is echter een veel nauwkeuriger en bovendien snellere meting en essentieel voor de selectie van onze stof in ons uiteindelijke ziektemodel. Bijlage I biedt ons de mogelijkheid relatief snel veel te testen, waarbij bijlage II meer voor een fase verder in het onderzoek is waarbij we ons richten op de effectiviteit.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Fluorescentie studie in wildtype muizen
2	Doseerstudies in Hurler muizen.
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90700				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	InnoSer Laboratories				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>1</td><td>Fluorescentie studie in de wildtype muis.</td></tr></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Fluorescentie studie in de wildtype muis.
Volgnummer	Type dierproef					
1	Fluorescentie studie in de wildtype muis.					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Deze dierproef is noodzakelijk voor het onderzoeken van de biodistributie van nieuwe oligonucleotiden in de muis.

De dieren krijgen de fluorescente gelabelde oligonucleotiden een- of meermalig toegediend via een specifiek geselecteerde methode aan de hand van de verwachtingen van de formulering, en vervolgens wordt er een analyse gedaan naar de biodistributie van de fluorescente oligonucleotiden in de muis.

De uitleesparameters zijn als volgt:

- Hoeveelheid teststof in het plasma na toediening (PK);
- Macroscopische lokalisatie na toediening (hoeveelheid fluorescentie per orgaan);

- nucleaire lokalisatie van de stof m.b.v. confocale microscopie;

Indien we de fluorescent-gelabelde teststof niet kunnen lokaliseren na toediening is dit een no-go, dan gaan we niet verder.

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

De behandeling van de dieren zal zijn: een of meerdere toedieningen van fluorescente gelabelde teststoffen via verschillende toedieningswijzen, we willen verschillende toedieningswijzen testen omdat Idua een belangrijke rol speelt in diverse weefsels en organen en daarom bestaat de kans dat er naast systemische toediening er ook lokale toedieningen worden getest (direct in de hersenen en het oog). Dit doen we om een beeld te krijgen van de beste doseringsstrategie van de oligonucleotiden.

In onderstaande tabel worden de verschillende technieken benoemd.

Nr.	Aard	Duur	Frequentie	Ongeriefinschatting
<u>Toedieningswijzen</u>				
1	IV injectie	2 min	<u>1-28</u>	<u>2-3</u>
2	Intranasaal doseren	1 min	<u>1-28</u>	<u>3</u>
3	Subcutaan injectie	1min	<u>1-28</u>	<u>2-3</u>
4	Long toediening	1min	<u>1-28</u>	<u>2-3</u>
5	Intravitreaal	1 min	<u>1</u>	<u>3</u>
6	Intracerebrale injecties	3 min	<u>1</u>	<u>3</u>
7	Intrathecale injecties	3 min	<u>1</u>	<u>3</u>
<u>Afname technieken</u>				
8	Bloedafname (Wangplexus)	1 min	<u>1-4</u>	<u>2</u>
9	Bloedafname (Staartvene)	1 min	<u>1-4</u>	<u>2</u>
10	Terminale bloedafname onder anesthesie	1 min	<u>1</u>	<u>2</u>
<u>Andere technieken</u>				
11	Huisvesten in metabolisme kooi	4 uur	<u>1-2</u>	<u>2</u>
12	Wegen	1 min	<u>1-28</u>	<u>2</u>

In bovenstaande tabel zal een eventuele toediening meerdere keren worden gedaan, in dit stadium van de ontwikkeling verwachten we maximaal 4 weken dagelijks te doseren, we schatten het ongerief in op matig, middels naregistratie zal alles dat minder dan 10x wordt gedoseerd zonder verdoving ingeschat worden als gering.

Intranasaal, intravitreaal, intracerebrale en intrathecale toediening zal onder anesthesie gebeuren, vandaar een hogere ongeriefinschatting.

Na maximaal 28 dagen worden de dieren opgeofferd en wordt bekeken waar de teststof wordt gelokaliseerd.

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

Er zijn diverse kwantitatieve (concentratie teststof) en semi-kwantitatieve (lokalisatie van teststof) uitleesparameters welke gebruikt kunnen worden voor statistische onderbouwing van de groepsgroottes. Uitkomsten van een pilot studie waarbij een enkele dosering van de teststof wordt gegeven en na diverse tijdstippen weefsels verzameld voor analyse (concentratie en lokalisatie) zal dienen als uitgangspunt voor de vervolgstudies. Gegevens van ieder stadium van de dierproef worden gebruikt om het aantal dieren per groep te bepalen voor het volgende stadium. We gaan ongeveer 4 muizen per tijdstip doseren en onderzoeken, dat is uit een internationale referentie voortgekomen getal (Ette, E. I., Kelman, A. W., Howie, C. A., & Whiting, B. (1995). Analysis of animal pharmacokinetic data: Performance of the one point per animal design. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, 23(6), 551–566. <http://doi.org/10.1007/BF02353461>). Verder verwachten we 2-3 groepen nodig te hebben om een optimale formulering te definiëren, en we hebben 3 doseringslevels en we verwachten 5-6 tijdstippen nodig te hebben voor een kinetiek inschatting.

In totaal komen we hiermee op 3 (formuleringen x 4 muizen) + 6 (tijdstippen op de beoogde dosering) x 4 (muizen) dan 4 (muizen) x 4 (doseringen: 0, laag, midden hoog). Totaal komen we dan op $12+24+16 = 52$ dieren. Omdat we verwachten dat formuleringen vaak vrij standaard zijn (saline/PBS) en er soms minimale effecten te verwachten zijn en we een keuze theoretisch al kunnen maken vermoeden we toch met 40 dieren toe te kunnen komen.

Deze aantallen zullen per experiment onderbouwd worden doormiddel van powercalculaties en vooraf met de IvD afgestemd worden. In het algemeen worden voor een dergelijke studie ongeveer 40 dieren gebruikt en verwachten we 4 studies per jaar uit te voeren (160 dieren per jaar, 800 dieren in 5 jaar).

B. De dieren

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

De muis zal waar mogelijk surplus uit eigen fok zijn, wildtypes (C57Black6J) waar geen experiment mee gedaan kan worden, of ze zullen worden besteld bij een proefdierleverancier. De muizen zullen tussen de 10 en 30 weken leeftijd worden gebruikt. Over het algemeen worden voor een dergelijke studie ongeveer 40 dieren gebruikt en verwachten we 4 studies per jaar uit te voeren (160 dieren per jaar, 800 dieren in 5 jaar). Er is geen sexe voorkeur, beide sexen kunnen worden gebruikt.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Voor de start van de experimenten wordt zoveel mogelijk informatie uit in vitro data gehaald, dat kan uit humaan weefsel of celweek zijn en zal bestaan uit: opname van de teststof door de cellen, functionele effecten, toxiciteit en immunogeniciteit.

Met betrekking tot het experiment zelf wordt er zoveel mogelijk data gehaald uit een individuele muis en naar aanleiding van de resultaten wordt pas na afstemming met de IvD een volgende stap in het project genomen, en wordt er bijvoorbeeld een andere formulering of toedieningswijze gekozen. Dat leidt uiteindelijk tot een weloverwogen traject dat doorlopen wordt, er wordt niet alles getest met slechts een formulering, en slechts een dosering, we 'testen niet om te testen', in die zin hopen we aan vermindering bij te dragen.

Omdat de ziekte van Hurler op zoveel plaatsen in het organisme effecten kan hebben is alleen het meten van GAG in urine niet toereikend. Daarnaast bestaat het vermoeden dat een meetbare verandering van GAG levels in Urine na interventie lastig te behalen is, al zijn we het met de DEC eens dat dit ook de voorkeur heeft, zeker voor de translatie naar de kliniek. Een correlatie tussen urine waarden en bepaalde mate van herstel, bereikt door onze therapie, is nog niet bekend. Het is meer waarschijnlijk dat onze therapie lage levels van Idua eiwit kan herstellen – welke voornamelijk op moleculair, biochemisch of m.b.v. histologische assays bepaald kan worden. Hiervoor hebben we weefsels nodig. Juist door het combineren van verschillende functionele / semi-functionele assays op weefsels van hetzelfde dier zijn we tot een vermindering van het beoogde aantal muizen gekomen.

We zullen de dieren daarnaast zo goed als mogelijk met de laatste technieken qua anesthesie behandelen indien anesthesie noodzakelijk is.

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

Alle dieren beschikken over voldoende voer, water, rust, en kooiverrijking, ook zullen de personen betrokken bij de studie bekwaam (en bevoegd) zijn. Gezien de werking van de nieuwe oligonucleotide verwachten we geen toxische effecten, pijn, lijden of angst, ook de formuleringen zullen dusdanig gekozen worden dat we hiervan geen negatieve effecten op het dierenwelzijn verwachten.

Injectietechnieken worden waar nodig uitgevoerd onder anesthesie.

We verwachten geen nadelige milieueffecten.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze dierproef is nieuw en noodzakelijk voor het in kaart brengen van de biodistributie van fluorescente oligonucleotiden (met als doel ADAR-

gemedieerde RNA-editing), dit bepaalt mede het succes waarmee het medicijn al dan niet kan worden ontwikkeld.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Sommige injectietechnieken die vrij invasief zijn en waarbij het standaard is dat er anesthesie wordt toegepast zullen onder Isofluraan worden uitgevoerd om de dieren zo min mogelijk stress te laten ervaren, de stress zal hierbij bestaan uit het bijkomen uit de anesthesie, dat schatten wij in als matig.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In sporadisch gevallen is het mogelijk dat meervoudige doseringen tot bijvoorbeeld ontstekingen leiden, zodra er een zichtbare ontsteking is of als de dieren > 20% afnemen in gewicht in een week tijd worden de dieren uit de proef genomen. Humane eindpunten worden ook bij de dagelijkse verzorging gemonitord, we werken louter met bevoegd en bekwaam personeel dat zich houdt aan de interne afspraken. Hieronder zijn er toedieningswijze een of meerdere humane eindpunten gedefinieerd.

Nr.	Aard	Duur (Min)	Freq- uentie	Ongerief- inschatting	Humane eindpunten
Toedieningswijzen					
1	IV injectie	2	1-28	2-3	De verwachting is bij herhaaldelijk injecteren dat er geen effecten te zien zullen zijn. Indien dieren een hematoom ontwikkelen door veelvuldig aanprikken zullen we de dieren offeren.
2	Intranasaal doseren	1	1-28	3	Dit gebeurt onder anesthesie en de stof wordt toegediend via de 'eigen' ademhaling, we verwachten hier geen humaan eindpunt mee te bereiken. Indien een dier onverhoopt in ademnood komt zullen we de dosering stoppen en het dier bij laten komen en later nogmaals doseren. Indien we daar hetzelfde zien zullen we het dier uit de proef nemen.
3	Subcutaan injectie	1	1-28	2-3	Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Indien we meerdere injecties toepassen zal iedere volgende injectie op een andere zijde (links of rechts) worden gezet.
4	Long toediening	1	1-28	2-3	Dit is een toediening via een nebulizer en hier hebben we goede ervaringen mee. We verwachten hier geen uitval noch een humaan eindpunt.
5	Intravitreaal	1	1	3	Dit is een eenmalige toediening onder anesthesie, hier verwachten we door de frequentie geen humane eindpunten. Indien er een infectie optreedt in het oog zal het dier onmiddellijk worden geofferd, zodra bij de injectie al duidelijk is dat het niet goed gaat, als het glasvocht er bijvoorbeeld uit loopt dan wordt het dier onmiddellijk geofferd. Komen we tijdens de dagelijkse controles erachter dat dieren blind raken dan nemen we de dieren uit voorzorg uit de proef.

6	Intracerebrale injecties	3	1	3	Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in de hersenen te vinden. Zodra we tekenen van geheel of gedeeltelijk verlamming constateren dan wordt het dier geofferd, indien we ataxie constateren zullen we de dieren intensiever dan dagelijks volgen, indien wij het idee hebben dat het dier meer dan matig ongerief ervaart zullen het afvoeren.
7	Intrathecale injecties	3	1	3	Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in het ruggenmerg te vinden. Hier kunnen we na het ontwaken uit narcose onmiddellijk waarnemen of een dier niet goed geïnjecteerd is. Zodra we tekenen van (geheel of gedeeltelijke) verlamming constateren dan wordt het dier geofferd.
	Andere technieken				
8	Wegen	1	1-28	2	Geen humaan eindpunt.
9	Beeldvorming	1	1-28	2	Geen, dit is het imageren onder anesthesie.
10	Anesthesie	1	4-8	2	Geen, echter anesthesie in het algemeen kan voor ademhalingsproblemen zorgen tijdens de anesthesie. Afhankelijk wat er gebeurt kan de hoeveelheid O2 iets worden aangepast. Na afloop zal de muis rustig bijkomen, de verwachting is niet dat hierbij een humaan eindpunt optreedt.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Cumulatief wordt het ongerief ingeschat als matig, ingegeven door de meervoudige doseringen en het eventueel meervoudig bijkomen uit anesthesie, er worden geen toxische effecten van de nieuwe oligonucleotiden verwacht (hiervoor wordt specifiek in vitro gescreend).

De standaard code of practice dierenwelzijnsbewaking wordt altijd aangehouden.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Het doden van de dieren is onderdeel van het experiment omdat er organen moeten worden afgenomen voor analyses.

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90700				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	InnoSer Laboratories				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>2</td><td>Doseerstudie Hurler muis.</td></tr></table>	Volgnummer	Type dierproef	2	Doseerstudie Hurler muis.
Volgnummer	Type dierproef					
2	Doseerstudie Hurler muis.					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Deze dierproef is noodzakelijk voor het onderzoeken van nieuwe oligonucleotiden in de Hurler muis. De Hurler muis, ofwel de Idua-W392X muis (Wang et al., 2010) is een muis met een afwijking in het Idua gen. Deze mutatie in de muis is analoog aan de p.Trp 402X mutatie in patienten met Hurler en een van de weinige beschikbare modellen voor dit ziektebeeld.

Deze muizen worden gedoseerd met verschillende formuleringen, toedieningswijze op verschillende tijdstippen.

De muizen krijgen de stof een- of meermalig toegediend via een specifiek geselecteerde methode op basis van de verwachtingen en vervolgens wordt er een analyse gedaan naar de effecten. Het experiment bestaat telkens uit dezelfde soort handelingen met 4 doelen:

1. Bepalen van de dosering waarbij optimale effecten worden bereikt d.m.v. diverse moleculaire, biochemische, enzymatische en histologische assays welke zowel de correctie op het RNA niveau (moleculair), Idua eiwit niveau en GAG levels (biochemisch) en de functie van Idua (enzymatisch,

- histologisch en functioneel) kunnen meten;
- 2. Bepaling van de optimale toedieningsroute;
- 3. Biodistributie van de nieuwe oligonucleotiden;

De uitleesparameters zijn als volgt:

Moleculair: Idua mRNA kwantificering en sequencing in diverse weefsels

Enzymatisch: Idua assay in weefsel

Biochemisch:

-Eiwit expressie van Idua;

-GAG bepaling in urine;

-GAG bepaling in weefsel;

Histologie: onderzoeken of cytoplasmische inclusive plaats hebben gevonden;

Functioneel:

-Morfologische afwijkingen;

-Gezichtskenmerken;

-Botontwikkeling in de Femur;

-Botmineraaldichtheid;

Aan de hand van de uitkomstparameters worden verdere stappen in de ontwikkeling tot een nieuw medicijn gedaan, dat kan zijn een andere toedieningswijze en/of andere formulering, zodanig dat de oligonucleotide zijn maximale effect heeft zodat er verder gegaan kan worden in het preklinisch traject naar de betreffende aandoening.

Dit type dierproef bestaat uit drie onderdelen:

1. Een enkele dosering wordt getest waarbij we de weefsels op verschillende tijdstippen willen isoleren om te kijken wat het beste tijdstip is en of er sprake is van een wash-out periode; De tijdstippen zijn gebaseerd op *in vitro* studies en eerdere bio distributiestudies met soortgelijke oligonucleotiden teststoffen waar een relatief hoge halfwaardetijd in weefsels was gevonden. Deze tijdstippen zijn o.a.: 24hr, 48hr, 7 en 14 dagen.

2. Pas daarna wordt een dosis-respons relatie gelegd op het optimale tijdstip, hierbij worden diverse doses getest (laag-middel-hoog) en proberen we tot een optimale doseringsvorm te komen;

3. Als laatste zullen we een meervoudige dosis-response relatie vastleggen, meerder doseringen variërend in de tijd. De meervoudige dosering zal gebaseerd zijn op de optimale dose (zie 2 hierboven) en de stabiliteit/effectiviteit in weefsels.

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

De behandeling van de dieren zal zijn: een of meerdere toedieningen van nieuwe oligonucleotiden in verschillende formuleringen via potentieel verschillende toedieningswijzen. De toedieningswijzen zijn grotendeels gebaseerd op de uitkomsten van dierproef 1, omdat die uitkomsten onbekend zijn noemen we hier alle mogelijkheden op, dit is een veelvoud van hetgeen we in de praktijk waarschijnlijk gaan testen.

In onderstaande tabel worden de verschillende technieken benoemd.

Nr.	Aard	Duur	Frequentie	Ongeriefinschatting
<u>Toedieningswijzen</u>				
1	IV injectie	2 min	<u>1-28</u>	<u>2-3</u>
2	Intranasaal doseren	1 min	<u>1-28</u>	<u>3</u>
3	Subcutaan injectie	1min	<u>1-28</u>	<u>2-3</u>
4	Long toediening	1min	<u>1-28</u>	<u>2-3</u>
5	Intravitreaal	1 min	<u>1</u>	<u>3</u>
6	Intracerebrale injecties	3 min	<u>1</u>	<u>3</u>
7	Intrathecale injecties	3 min	<u>1</u>	<u>3</u>
<u>Afname technieken</u>				
8	Bloedafname (Wangplexus)	1 min	<u>1-4</u>	<u>2</u>
9	Bloedafname (Staartvene)	1 min	<u>1-4</u>	<u>2</u>
10	Terminale bloedafname onder anesthesie	1 min	<u>1</u>	<u>2</u>
<u>Andere technieken</u>				
11	Huisvesten in metabolisme kooi	4 uur	<u>1-2</u>	<u>2</u>
12	Wegen	1 min	<u>1-28</u>	<u>2</u>

In bovenstaande tabel zal een eventuele toediening meerdere keren worden gedaan, in dit stadium van de ontwikkeling verwachten we maximaal 4 weken dagelijks te doseren, maar dat zal lang niet altijd gelden. Intranasaal, intravitreaal, intracerebrale en intrathecale toediening zal onder anesthesie gebeuren, vandaar een hogere ongeriefinschatting. Indien een toediening vaker dan 10x wordt uitgevoerd zullen we deze naregistreren als matig, dat zal niet altijd het geval zijn, indien het minder dan 10x is zal het als gering worden geregistreerd.

Bloedafname volumes en frequenties zullen beperkt worden volgens Diehl et al 2001, er is rekening gehouden met 4 maal een bloedafname, waarbij gekozen wordt tussen de twee technieken wang of staart.

Terminale bloedafname en bijbehorende weefselafname kan gedaan worden enkele dagen of enkele weken na toediening.

Wang D, Shukla C, Liu X, Schoeb TR, Clarke LA, Bedwell DM, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. Mol Genet Metab. Jan;99(1):62–71 (2010) .

Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M and Vorstenbosch C. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001).

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

Er zijn diverse kwantitatieve uitleesparameters [GAGs in urine en weefsels, histologische scores, botdichtheid en moleculaire/biochemische parameters] welke gebruikt kunnen worden voor statistische onderbouwing van de groepsgroottes. Een pilot studie waarbij de verschillen van diverse uitleesparameters tussen muizen met de IDUA mutatie en gezonde nestgenoten worden vergeleken zal inzicht geven in de groepsgrootte

voor de studies.

We gaan ongeveer 4 muizen per tijdstip doseren en onderzoeken, dat is uit een internationale referentie voortgekomen getal (Ette, E. I., Kelman, A. W., Howie, C. A., & Whiting, B. (1995). Analysis of animal pharmacokinetic data: Performance of the one point per animal design. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, 23(6), 551–566. <http://doi.org/10.1007/BF02353461>). Verder verwachten we 2-3 groepen nodig te hebben om een optimale formulering te definiëren, en we hebben 3 doseringslevels en we verwachten 5-6 tijdstippen nodig te hebben voor een kinetiek inschatting.

In totaal komen we hiermee op 3 (formuleringen x 4 muizen) + 6 (tijdstippen op de beoogde dosering) x 4 (muizen) dan 4 (muizen) x 4 (doseringen: 0, laag, midden hoog). Totaal komen we dan op 12+24+16 = 52 dieren. Omdat we verwachten dat formuleringen vaak vrij standaard zijn (saline/PBS) en er soms minimale effecten te verwachten zijn en we een keuze theoretisch al kunnen maken vermoeden we toch met 40 dieren toe te kunnen komen.

Gegevens van elk stadium van de dierproef worden gebruikt om het aantal dieren per groep te bepalen voor het volgende stadium. Deze aantallen zullen per experiment onderbouwd worden doormiddel van powercalculaties en vooraf met de IvD afgestemd worden.

B. De dieren

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

De Hurler muis heeft een 'nonsense' mutatie op het Idua codon (analoog aan humane p.Trp 402X mutatie) en is daarmee het ideale model voor de ziekte van Hurler. Deze muizen ondervinden gering ongerief door de aangebrachte modificatie, de muizen zijn vitaal en vruchtbaar, er is sprake van verdikking van de femur na 15 weken en de botdichtheid is verhoogd na 35 weken. De levensverwachting is 69 weken, dat is korter dan wildtype muizen (uit de Jax database), mede daarop baseren wij het verwachtte ongerief van gering.

Voor de behandeling zullen voornamelijk muizen tussen de 10 en 30 weken gebruikt worden, omdat in dit stadium de GAG ophoping in weefsels en excretie in de urine significant verschillend is ten opzichte van gezonde muizen.

Daarnaast ligt de overlevingskans tot 30 weken rond de 90% (Wang et al., 2010). Op basis van soortgelijke studies, verwachten we per jaar 6 studies uit te voeren met gemiddeld 40 dieren per studie. Over een periode van 5 jaar zijn dit 960 dieren. Specifieke aantallen per experiment zullen met de IvD worden afgestemd en zullen worden onderbouwd d.m.v. power calculaties.

(Wang D, Shukla C, Liu X, Schoeb TR, Clarke LA, Bedwell DM, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. Mol Genet Metab. 2010;99: 62–71).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Qua monitoring zal van de dieren worden bijgehouden hoeveel bloed er is afgenomen en er geen maximale waarden (Diehl et al., 2001) worden overschreden.

Voor de start van de experimenten wordt zoveel mogelijk informatie uit in vitro data gehaald, dat kan uit humaan weefsel of celkweek zijn waarbij gebruik zal worden gemaakt met embryonale fibroblasten van de Hurler muis, pas daarna worden alle vervolgstappen genomen om zo min mogelijk dieren te gebruiken.

Met betrekking tot het experiment zelf wordt er zoveel mogelijk data gehaald uit een individuele muis en naar aanleiding van de resultaten wordt pas na afstemming met de IvD een volgende stap in het project genomen, en wordt er bijvoorbeeld een andere formulering of toedieningswijze gekozen. Dat leidt uiteindelijk tot een weloverwogen traject dat doorlopen wordt, er wordt niet alles getest met een formulering, en een dosering, we 'testen niet om te testen', in die zin hopen wij ook aan vermindering bij te dragen. Mede door de uitkomsten uit dierproef 1 in te zetten verwachten we minder dieren met het ziektemodel te gebruiken.

Omdat de ziekte van Hurler op zoveel plaatsen in het organisme effecten kan hebben is alleen het meten van GAG in urine niet toereikend. Daarnaast bestaat het vermoeden dat een meetbare verandering van GAG levels in Urine na interventie lastig te behalen is, al zijn we het met de DEC eens dat dit ook de voorkeur heeft, zeker voor de translatie naar de kliniek. Een correlatie tussen urine waardes en bepaalde mate van herstel, bereikt door onze therapie, is nog niet bekend. Het is meer waarschijnlijk dat onze therapie lage levels van Idua eiwit kan herstellen – welke voornamelijk op moleculair, biochemisch of m.b.v. histologische assays bepaald kan worden. Hiervoor hebben we weefsels nodig. Juist door het combineren van verschillende functionele / semi-functionele assays op weefsels van hetzelfde dier zijn we tot een vermindering van het beoogde aantal muizen gekomen.

We zullen de dieren daarnaast de laatste technieken qua anesthesie gebruiken (indien anesthesie noodzakelijk).

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

Alle dieren beschikken over voldoende voer, water, rust, en kooiverrijking, ook zullen de personen betrokken bij de studie bekwaam (en bevoegd) zijn. Gezien de werking van de nieuwe oligonucleotide verwachten we geen toxische effecten, pijn, lijden of angst, ook de formuleringen zullen dusdanig gekozen worden dat we hiervan geen negatieve effecten op het dierenwelzijn verwachten.

Injectietechnieken worden waar nodig uitgevoerd onder anesthesie.

We verwachten geen nadelige milieueffecten.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze dierproef is nieuw en noodzakelijk voor het in kaart brengen van de effecten op een model voor de ziekte van Hurler met nieuwe oligonucleotiden, dit bepaalt mede het succes waarmee het medicijn al dan niet kan worden ontwikkeld.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Sommige injectietechnieken waarbij het standaard is dat er anesthesie wordt toegepast zullen onder Isofluraan worden uitgevoerd om de dieren zo min mogelijk stress te laten ervaren, de stress zal hierbij bestaan uit het bijkomen uit de anesthesie, dat schatten wij in als matig.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In sporadisch gevallen is het mogelijk dat meervoudige doseringen tot bijvoorbeeld ontstekingen leiden, zodra er een zichtbare ontsteking is of als de dieren > 20% afnemen in gewicht in een week tijd worden de dieren uit de proef genomen. Humane eindpunten worden ook bij de dagelijkse verzorging gemonitord, we werken louter met bevoegd en bekwaam personeel dat zich houdt aan de interne afspraken. Hieronder zijn er toedieningswijze een of meerdere humane eindpunten gedefinieerd.

Nr.	Aard	Duur (Min)	Frequentie	Ongerief-inschatting	Humane eindpunten
Toedieningswijzen					
1	IV injectie	2	1-28	2-3	De verwachting is bij herhaaldelijk injecteren dat er geen effecten te zien zullen zijn. Indien dieren een hematoom ontwikkelen door veelvuldig aanprikken zullen we de dieren offeren.
2	Intranasaal doseren	1	1-28	3	Dit gebeurt onder anesthesie en de stof wordt toegediend via de 'eigen' ademhaling, we verwachten hier geen humaan eindpunt mee te bereiken. Indien een dier onverhoopt in ademnood komt zullen we de dosering stoppen en het dier bij laten komen en later nogmaals doseren. Indien we daar hetzelfde zien zullen we het dier uit de proef nemen.
3	Subcutaan injectie	1	1-28	2-3	Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Indien we meerdere injecties toepassen zal iedere volgende injectie op een andere zijde (links of rechts) worden gezet.
4	Long toediening	1	1-28	2-3	Dit is een toediening via een nebulizer en hier hebben we goede ervaringen mee. We verwachten hier geen uitval noch een humaan eindpunt.
5	Intravitreaal	1	1	3	Dit is een eenmalige toediening onder anesthesie, hier verwachten we door de frequentie geen humane eindpunten. Indien er een infectie optreedt in het oog zal het dier onmiddellijk worden geofferd, zodra bij de injectie al duidelijk is dat het niet goed gaat, als het glasvocht er bijvoorbeeld uit loopt dan wordt het dier onmiddellijk geofferd. Komen we tijdens de dagelijkse controles erachter dat dieren blind raken dan nemen we de dieren uit voorzorg uit

					de proef.
6	Intracerebrale injecties	3	1	3	Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in de hersenen te vinden. Zodra we tekenen van geheel of gedeeltelijk verlamming constateren dan wordt het dier geofferd, indien we ataxie constateren zullen we de dieren intensiever dan dagelijks volgen, indien wij het idee hebben dat het dier meer dan matig ongerief ervaart zullen het afvoeren.
7	Intrathecale injecties	3	1	3	Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in het ruggenmerg te vinden. Hier kunnen we na het ontwaken uit narcose onmiddellijk waarnemen of een dier niet goed geïnjecteerd is. Zodra we tekenen van (geheel of gedeeltelijke) verlamming constateren dan wordt het dier geofferd.
	Andere technieken				
8	Wegen	1	1-28	2	Geen humaan eindpunt.
9	Beeldvorming	1	1-28	2	Geen, dit is het imagen onder anesthesie.
10	Anesthesie	1	4-8	2	Geen, echter anesthesie in het algemeen kan voor ademhalingsproblemen zorgen tijdens de anesthesie. Afhankelijk wat er gebeurt kan de hoeveelheid O2 iets worden aangepast. Na afloop zal de muis rustig bijkomen, de verwachting is niet dat hierbij een humaan eindpunt optreedt.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Cumulatief wordt het ongerief ingeschat als matig, ingegeven door de meervoudige doseringen en het eventueel meervoudig bijkomen uit anesthesie, er worden geen toxische effecten van de nieuwe oligonucleotiden verwacht (hiervoor wordt specifiek in vitro gescreend). De standaard code of practice dierenwelzijnsbewaking wordt altijd aangehouden.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Het doden van de dieren is onderdeel van het experiment omdat er organen worden afgenomen voor analyses.

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90700				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	InnoSer Laboratories				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>2</td><td>Doseerstudie Hurler muis.</td></tr></table>	Volgnummer	Type dierproef	2	Doseerstudie Hurler muis.
Volgnummer	Type dierproef					
2	Doseerstudie Hurler muis.					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Deze dierproef is noodzakelijk voor het onderzoeken van nieuwe oligonucleotiden in de Hurler muis. De Hurler muis, ofwel de Idua-W392X muis (Wang et al., 2010) is een muis met een afwijking in het Idua gen. Deze mutatie in de muis is analoog aan de p.Trp 402X mutatie in patienten met Hurler en een van de weinige beschikbare modellen voor dit ziektebeeld.

Deze muizen worden gedoseerd met verschillende formuleringen, toedieningswijze op verschillende tijdstippen.

De muizen krijgen de stof een- of meermalig toegediend via een specifiek geselecteerde methode op basis van de verwachtingen en vervolgens wordt er een analyse gedaan naar de effecten. Het experiment bestaat telkens uit dezelfde soort handelingen met 4 doelen:

1. Bepalen van de dosering waarbij optimale effecten worden bereikt d.m.v. diverse moleculaire, biochemische, enzymatische en histologische assays welke zowel de correctie op het RNA niveau (moleculair), Idua eiwit niveau en GAG levels (biochemisch) en de functie van Idua (enzymatisch,

- histologisch en functioneel) kunnen meten;
- 2. Bepaling van de optimale toedieningsroute;
- 3. Biodistributie van de nieuwe oligonucleotiden;

De uitleesparameters zijn als volgt:

Moleculair: Idua mRNA kwantificering en sequencing in diverse weefsels

Enzymatisch: Idua assay in weefsel

Biochemisch:

-Eiwit expressie van Idua;

-GAG bepaling in urine;

-GAG bepaling in weefsel;

Histologie: onderzoeken of cytoplasmische inclusive plaats hebben gevonden;

Functioneel:

-Morfologische afwijkingen;

-Gezichtskenmerken;

-Botontwikkeling in de Femur;

-Botmineraaldichtheid;

Aan de hand van de uitkomstparameters worden verdere stappen in de ontwikkeling tot een nieuw medicijn gedaan, dat kan zijn een andere toedieningswijze en/of andere formulering, zodanig dat de oligonucleotide zijn maximale effect heeft zodat er verder gegaan kan worden in het preklinisch traject naar de betreffende aandoening.

Dit type dierproef bestaat uit drie onderdelen:

1. Een enkele dosering wordt getest waarbij we de weefsels op verschillende tijdstippen willen isoleren om te kijken wat het beste tijdstip is en of er sprake is van een wash-out periode; De tijdstippen zijn gebaseerd op *in vitro* studies en eerdere bio distributiestudies met soortgelijke oligonucleotiden teststoffen waar een relatief hoge halfwaardetijd in weefsels was gevonden. Deze tijdstippen zijn o.a.: 24hr, 48hr, 7 en 14 dagen.

2. Pas daarna wordt een dosis-respons relatie gelegd op het optimale tijdstip, hierbij worden diverse doses getest (laag-middel-hoog) en proberen we tot een optimale doseringsvorm te komen;

3. Als laatste zullen we een meervoudige dosis-response relatie vastleggen, meerder doseringen variërend in de tijd. De meervoudige dosering zal gebaseerd zijn op de optimale dose (zie 2 hierboven) en de stabiliteit/effectiviteit in weefsels.

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

De behandeling van de dieren zal zijn: een of meerdere toedieningen van nieuwe oligonucleotiden in verschillende formuleringen via potentieel verschillende toedieningswijzen. De toedieningswijzen zijn grotendeels gebaseerd op de uitkomsten van dierproef 1, omdat die uitkomsten onbekend zijn noemen we hier alle mogelijkheden op, dit is een veelvoud van hetgeen we in de praktijk waarschijnlijk gaan testen.

In onderstaande tabel worden de verschillende technieken benoemd.

Nr.	Aard	Duur	Frequentie	Ongeriefinschatting
<u>Toedieningswijzen</u>				
1	IV injectie	2 min	<u>1-28</u>	<u>2-3</u>
2	Intranasaal doseren	1 min	<u>1-28</u>	<u>3</u>
3	Subcutaan injectie	1min	<u>1-28</u>	<u>2-3</u>
4	Long toediening	1min	<u>1-28</u>	<u>2-3</u>
5	Intravitreaal	1 min	<u>1</u>	<u>3</u>
6	Intracerebrale injecties	3 min	<u>1</u>	<u>3</u>
7	Intrathecale injecties	3 min	<u>1</u>	<u>3</u>
<u>Afname technieken</u>				
8	Bloedafname (Wangplexus)	1 min	<u>1-4</u>	<u>2</u>
9	Bloedafname (Staartvene)	1 min	<u>1-4</u>	<u>2</u>
10	Terminale bloedafname onder anesthesie	1 min	<u>1</u>	<u>2</u>
<u>Andere technieken</u>				
11	Huisvesten in metabolisme kooi	4 uur	<u>1-2</u>	<u>2</u>
12	Wegen	1 min	<u>1-28</u>	<u>2</u>

In bovenstaande tabel zal een eventuele toediening meerdere keren worden gedaan, in dit stadium van de ontwikkeling verwachten we maximaal 4 weken dagelijks te doseren, maar dat zal lang niet altijd gelden. Intranasaal, intravitreaal, intracerebrale en intrathecale toediening zal onder anesthesie gebeuren, vandaar een hogere ongeriefinschatting. Indien een toediening vaker dan 10x wordt uitgevoerd zullen we deze naregistreren als matig, dat zal niet altijd het geval zijn, indien het minder dan 10x is zal het als gering worden geregistreerd.

Bloedafname volumes en frequenties zullen beperkt worden volgens Diehl et al 2001, er is rekening gehouden met 4 maal een bloedafname, waarbij gekozen wordt tussen de twee technieken wang of staart.

Terminale bloedafname en bijbehorende weefselafname kan gedaan worden enkele dagen of enkele weken na toediening.

Wang D, Shukla C, Liu X, Schoeb TR, Clarke LA, Bedwell DM, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. Mol Genet Metab. Jan;99(1):62–71 (2010) .

Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M and Vorstenbosch C. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001).

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

Er zijn diverse kwantitatieve uitleesparameters [GAGs in urine en weefsels, histologische scores, botdichtheid en moleculaire/biochemische parameters] welke gebruikt kunnen worden voor statistische onderbouwing van de groepsgroottes. Een pilot studie waarbij de verschillen van diverse uitleesparameters tussen muizen met de IDUA mutatie en gezonde nestgenoten worden vergeleken zal inzicht geven in de groepsgrootte

voor de studies.

We gaan ongeveer 4 muizen per tijdstip doseren en onderzoeken, dat is uit een internationale referentie voortgekomen getal (Ette, E. I., Kelman, A. W., Howie, C. A., & Whiting, B. (1995). Analysis of animal pharmacokinetic data: Performance of the one point per animal design. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, 23(6), 551–566. <http://doi.org/10.1007/BF02353461>). Verder verwachten we 2-3 groepen nodig te hebben om een optimale formulering te definiëren, en we hebben 3 doseringslevels en we verwachten 5-6 tijdstippen nodig te hebben voor een kinetiek inschatting.

In totaal komen we hiermee op 3 (formuleringen x 4 muizen) + 6 (tijdstippen op de beoogde dosering) x 4 (muizen) dan 4 (muizen) x 4 (doseringen: 0, laag, midden hoog). Totaal komen we dan op 12+24+16 = 52 dieren. Omdat we verwachten dat formuleringen vaak vrij standaard zijn (saline/PBS) en er soms minimale effecten te verwachten zijn en we een keuze theoretisch al kunnen maken vermoeden we toch met 40 dieren toe te kunnen komen.

Gegevens van elk stadium van de dierproef worden gebruikt om het aantal dieren per groep te bepalen voor het volgende stadium. Deze aantallen zullen per experiment onderbouwd worden doormiddel van powercalculaties en vooraf met de IvD afgestemd worden.

B. De dieren

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

De Hurler muis heeft een 'nonsense' mutatie op het Idua codon (analoog aan humane p.Trp 402X mutatie) en is daarmee het ideale model voor de ziekte van Hurler. Deze muizen ondervinden gering ongerief door de aangebrachte modificatie, de muizen zijn vitaal en vruchtbaar, er is sprake van verdikking van de femur na 15 weken en de botdichtheid is verhoogd na 35 weken. De levensverwachting is 69 weken, dat is korter dan wildtype muizen (uit de Jax database), mede daarop baseren wij het verwachtte ongerief van gering.

Voor de behandeling zullen voornamelijk muizen tussen de 10 en 30 weken gebruikt worden, omdat in dit stadium de GAG ophoping in weefsels en excretie in de urine significant verschillend is ten opzichte van gezonde muizen.

Daarnaast ligt de overlevingskans tot 30 weken rond de 90% (Wang et al., 2010). Op basis van soortgelijke studies, verwachten we per jaar 6 studies uit te voeren met gemiddeld 40 dieren per studie. Over een periode van 5 jaar zijn dit 1200 dieren. Specifieke aantallen per experiment zullen met de IvD worden afgestemd en zullen worden onderbouwd d.m.v. power calculaties.

(Wang D, Shukla C, Liu X, Schoeb TR, Clarke LA, Bedwell DM, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. Mol Genet Metab. 2010;99: 62–71).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Qua monitoring zal van de dieren worden bijgehouden hoeveel bloed er is afgenomen en er geen maximale waarden (Diehl et al., 2001) worden overschreden.

Voor de start van de experimenten wordt zoveel mogelijk informatie uit in vitro data gehaald, dat kan uit humaan weefsel of celkweek zijn waarbij gebruik zal worden gemaakt met embryonale fibroblasten van de Hurler muis, pas daarna worden alle vervolgstappen genomen om zo min mogelijk dieren te gebruiken.

Met betrekking tot het experiment zelf wordt er zoveel mogelijk data gehaald uit een individuele muis en naar aanleiding van de resultaten wordt pas na afstemming met de IvD een volgende stap in het project genomen, en wordt er bijvoorbeeld een andere formulering of toedieningswijze gekozen. Dat leidt uiteindelijk tot een weloverwogen traject dat doorlopen wordt, er wordt niet alles getest met een formulering, en een dosering, we 'testen niet om te testen', in die zin hopen wij ook aan vermindering bij te dragen. Mede door de uitkomsten uit dierproef 1 in te zetten verwachten we minder dieren met het ziektemodel te gebruiken.

Omdat de ziekte van Hurler op zoveel plaatsen in het organisme effecten kan hebben is alleen het meten van GAG in urine niet toereikend. Daarnaast bestaat het vermoeden dat een meetbare verandering van GAG levels in Urine na interventie lastig te behalen is, al zijn we het met de DEC eens dat dit ook de voorkeur heeft, zeker voor de translatie naar de kliniek. Een correlatie tussen urine waardes en bepaalde mate van herstel, bereikt door onze therapie, is nog niet bekend. Het is meer waarschijnlijk dat onze therapie lage levels van Idua eiwit kan herstellen – welke voornamelijk op moleculair, biochemisch of m.b.v. histologische assays bepaald kan worden. Hiervoor hebben we weefsels nodig. Juist door het combineren van verschillende functionele / semi-functionele assays op weefsels van hetzelfde dier zijn we tot een vermindering van het beoogde aantal muizen gekomen.

We zullen de dieren daarnaast de laatste technieken qua anesthesie gebruiken (indien anesthesie noodzakelijk).

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

Alle dieren beschikken over voldoende voer, water, rust, en kooiverrijking, ook zullen de personen betrokken bij de studie bekwaam (en bevoegd) zijn. Gezien de werking van de nieuwe oligonucleotide verwachten we geen toxische effecten, pijn, lijden of angst, ook de formuleringen zullen dusdanig gekozen worden dat we hiervan geen negatieve effecten op het dierenwelzijn verwachten.

Injectietechnieken worden waar nodig uitgevoerd onder anesthesie.

We verwachten geen nadelige milieueffecten.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze dierproef is nieuw en noodzakelijk voor het in kaart brengen van de effecten op een model voor de ziekte van Hurler met nieuwe oligonucleotiden, dit bepaalt mede het succes waarmee het medicijn al dan niet kan worden ontwikkeld.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Sommige injectietechnieken waarbij het standaard is dat er anesthesie wordt toegepast zullen onder Isofluraan worden uitgevoerd om de dieren zo min mogelijk stress te laten ervaren, de stress zal hierbij bestaan uit het bijkomen uit de anesthesie, dat schatten wij in als matig.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In sporadisch gevallen is het mogelijk dat meervoudige doseringen tot bijvoorbeeld ontstekingen leiden, zodra er een zichtbare ontsteking is of als de dieren > 20% afnemen in gewicht in een week tijd worden de dieren uit de proef genomen. Humane eindpunten worden ook bij de dagelijkse verzorging gemonitord, we werken louter met bevoegd en bekwaam personeel dat zich houdt aan de interne afspraken. Hieronder zijn er toedieningswijze een of meerdere humane eindpunten gedefinieerd.

Nr.	Aard	Duur (Min)	Frequentie	Ongeriefsinschatting	Humane eindpunten
Toedieningswijzen					
1	IV injectie	2	1-28	2-3	De verwachting is bij herhaaldelijk injecteren dat er geen effecten te zien zullen zijn. Indien dieren een hematoom ontwikkelen door veelvuldig aanprikken zullen we de dieren offeren.
2	Intranasaal doseren	1	1-28	3	Dit gebeurt onder anesthesie en de stof wordt toegediend via de 'eigen' ademhaling, we verwachten hier geen humaan eindpunt mee te bereiken. Indien een dier onverhoopt in ademnood komt zullen we de dosering stoppen en het dier bij laten komen en later nogmaals doseren. Indien we daar hetzelfde zien zullen we het dier uit de proef nemen.
3	Subcutaan injectie	1	1-28	2-3	Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Indien we meerdere injecties toepassen zal iedere volgende injectie op een andere zijde (links of rechts) worden gezet.
4	Long toediening	1	1-28	2-3	Dit is een toediening via een nebulizer en hier hebben we goede ervaringen mee. We verwachten hier geen uitval noch een humaan eindpunt.
5	Intravitreaal	1	1	3	Dit is een eenmalige toediening onder anesthesie, hier verwachten we door de frequentie geen humane eindpunten. Indien er een infectie optreedt in het oog zal het dier onmiddellijk worden geofferd, zodra bij de injectie al duidelijk is dat het niet goed gaat, als het glasvocht er bijvoorbeeld uit loopt dan wordt het dier onmiddellijk geofferd. Komen we tijdens de dagelijkse controles erachter dat dieren blind raken dan nemen we de dieren uit voorzorg uit

					de proef.
6	Intracerebrale injecties	3	1	3	Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in de hersenen te vinden. Zodra we tekenen van geheel of gedeeltelijk verlamming constateren dan wordt het dier geofferd, indien we ataxie constateren zullen we de dieren intensiever dan dagelijks volgen, indien wij het idee hebben dat het dier meer dan matig ongerief ervaart zullen het afvoeren.
7	Intrathecale injecties	3	1	3	Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in het ruggenmerg te vinden. Hier kunnen we na het ontwaken uit narcose onmiddellijk waarnemen of een dier niet goed geïnjecteerd is. Zodra we tekenen van (geheel of gedeeltelijke) verlamming constateren dan wordt het dier geofferd.
	Andere technieken				
8	Wegen	1	1-28	2	Geen humaan eindpunt.
9	Beeldvorming	1	1-28	2	Geen, dit is het imagen onder anesthesie.
10	Anesthesie	1	4-8	2	Geen, echter anesthesie in het algemeen kan voor ademhalingsproblemen zorgen tijdens de anesthesie. Afhankelijk wat er gebeurt kan de hoeveelheid O2 iets worden aangepast. Na afloop zal de muis rustig bijkomen, de verwachting is niet dat hierbij een humaan eindpunt optreedt.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Cumulatief wordt het ongerief ingeschat als matig, ingegeven door de meervoudige doseringen en het eventueel meervoudig bijkomen uit anesthesie, er worden geen toxische effecten van de nieuwe oligonucleotiden verwacht (hiervoor wordt specifiek in vitro gescreend). De standaard code of practice dierenwelzijnsbewaking wordt altijd aangehouden.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Het doden van de dieren is onderdeel van het experiment omdat er organen worden afgenomen voor analyses.

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Innoser Laboratories BV

Zernikedreef 9

2333 CK LEIDEN



**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
AVD9070020171164

Bijlagen

2

Datum 24 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 maart 2017. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD9070020171164. 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).

Datum:

24 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD9070020171164

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
24 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD9070020171164

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 90700
Naam instelling of organisatie: Innoser Laboratories BV
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: XXXXXXXXXX
KvK-nummer: 61886890
Straat en huisnummer: Zernikedreef 9
Postcode en plaats: 2333 CK LEIDEN
IBAN: NL22ABNA0581547756
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: InnoSer Laboratories

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 april 2017

Geplande einddatum:

31 maart 2022

Titel project:

Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom.

Titel niet-technische samenvatting:

Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van de ziekte van Hurler.

Naam DEC:

DEC Rug/ UMCG

E-mailadres DEC:

secredec.umcg@umcg.nl

Betalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.287,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

[x] Projectvoorstel
[x] Beschrijving Dierproeven
[x] Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

[x] DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Leiden

Datum:

23 maart 2017

Datum:

24 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD9070020171164



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Innoser Laboratories BV



Zernikedreef 9

2333 CK LEIDEN



**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
AVD9070020171164

Bijlagen

2

Datum 24 maart 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 24 maart 2017

Vervaldatum: 23 april 2017

Factuurnummer: 171164

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD9070020171164	€ 1.287,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer Interne RUG code **8089**
2. Titel van het project: **Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom**
3. Titel van de NTS: **Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van de ziekte van Hurler.**
4. Type aanvraag:
 - ☒ **nieuwe aanvraag projectvergunning**
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC-RUG**
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC **09-02-2017**
 - ☐ aanvraag compleet **09-02-2017**
 - ☐ in vergadering besproken **16-02-2017**
 - ☐ anderszins behandeld **02-03-2017, 08-03-2017, 14-03-2017**
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot **22-02-2017 tot 27-02-2017, 02-03-2017 tot 07-03-2017, 08-03-2017 tot 13-03-2017**
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - ☐ aanpassing aanvraag **27-02-2017, 07-03-2017, 14-03-2017**
 - ☐ advies aan CCD: **17-03-2017**
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.
8. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager

Datum **22-02-2017, 02-03-2017, 08-03-2017**

Vragen/opmerkingen

- 1/Kunt u nader aangeven waarom U op voorhand in beide bijlagen herhaling en duplicering uitsluit?
- 2/Oligonucleotiden sorteren hun effect met name in de celkern. Is het niet relevanter de concentratie van GAG's in weefsels als uitleesparameter (al dan niet in combinatie met de orgaanfluorescentie door de teststof) te bepalen dan de hoeveelheid teststof in het plasma?
- 3/U geeft aan dat de biosafety bij Hurler muizen zal worden onderzocht en waarschijnlijk ook impliciet bij wildtype muizen. Er zijn aanwijzingen voor toxische effecten van oligonucleotiden bij toediening aan de mens (zie ondermeer van Poelgeest. Am J Kidney Dis 2013;62:796-800). Welke toxische effecten verwacht u met name bij de wildtype en Hurler muizen na toediening van uw teststoffen?
- 4/Gezien de beoogde toedieningsfrequentie en de lokalisatie van sommige toedieningen zouden toch wel humane eindpunten geformuleerd moeten kunnen worden in beide bijlagen met een beetje (meer) fantasie.
- 5/Kunt u nader schetsen/onderbouwen waarom ongeveer 40 dieren per teststof nodig zijn?
- 6/ Kunt u aangeven waarom wildtype muizen tussen de 5 en 16 weken leeftijd worden gebruikt in vergelijking tot 10-30 weken oude Hurler muizen?
- 7/Indien u de concentratie van GAG's in de urine als uitleesparameter bij de Hurlermuizen gebruikt voor de effectiviteit van de betreffende oligonucleotide kunt u herhaalde metingen aan hetzelfde dier doen ter vaststelling van ondermeer de wash-out periode, een dosis-effect-curve, meervoudige dosis-response relatie, etc en daarmee mogelijk vermindering bewerkstelligen. Het aankruisen van C (hergebruik van dieren) met Nee lijkt te vermoeden dat u dit niet als mogelijkheid ziet. Waarom?
- 8/U lijkt uw doel al redelijk te zijn genaderd. Waarom voorziet u de komende 5 jaar dan steeds 4 studies te moeten uitvoeren met wildtype dieren? In dit licht komt de stelling dat u op basis van soortgelijke studies verwacht over 5 jaar 30 studies uit te voeren met gemiddeld 40 Hurler muizen per studie ook wat merkwaardig over.
- 9/NTS: mogelijk wat te hoog gegrepen voor een leek.

Vervolg vragen:

- 1/Uw onderzoek is louter translationeel van aard. In dit kader geeft u ook aan dat het essentieel is dat plasma wordt gemeten zodat *'we ook voor de klinische fase iets hebben aan de data, in de kliniek kunnen we geen organen isoleren om levels te bepalen. Hier zijn we afhankelijk van plasmawaarden en zullen daarom in onze datasets ook effecten aan plaswaarden proberen te koppelen zodat we hier humaan een uitspraak kunnen doen over de optimale klinische dosis'*. Het lijkt buiten kijf te staan dat uw onderzoek aan de Hurlermuis geëxtrapoleerd moet kunnen worden naar de klinische toepassing bij de mens. Het gendefect leidt tot een systemische disfunctie en het lijkt daarom essentieel dat de door u beoogde oligonucleotiden systemisch werkzaam moeten zijn, waardoor locale toediening obsoleet lijkt. In uw bijlagen geeft u een uitputtend overzicht van de optionele toedieningslocalisaties en hun frequenties. In relatie hiermee is hetgeen u nu als humaan eindpunt toevoegt bezwaarlijk serieus te nemen. Gelieve de humane eindpunten in overeenstemming te brengen met het scala aan optionele toedieningslocalisaties en hun frequenties, waarbij het aanbeveling lijkt te verdienen advies van een dierenarts in te roepen. Mogelijk is zelfs te prefereren de locale toedieningslocalisaties uit de lijst te schrappen, die niet relevant lijken voor toepassing bij (humane) patiënten.
- 2/De DEC-RuG heeft U de suggestie aan de hand gedaan om GAG-bepalingen in urine te doen, waardoor herhaalde metingen aan hetzelfde dier mogelijk zijn teneinde te komen tot vermindering van gebruik van proefdieren. Ondanks dat u voornemens bent deze bepaling te gaan uitvoeren heeft dit in het geheel niet geresulteerd in een vermindering van de beoogde aantallen proefdieren.
- 3/Onder uw antwoord op vraag 2a geeft u aan dat u wilt "meten of het werkt". Dit suggereert natuurlijk dat u uiteindelijk geïnteresseerd bent in het (klinische) effect op de Hurlermuis. Bij het achterwege blijven van een klinisch effect van toediening van oligonucleotiden lijkt bepaling van weefselconcentraties minder zinvol, nietwaar?
- 4/In deze versie van het project voorstel leest de DEC-RuG nog steeds dat met betrekking tot het experiment zelf er zoveel mogelijk data gehaald worden uit een individuele muis en naar aanleiding van de resultaten wordt pas na afstemming met de IvD een volgende stap in het project genomen, en wordt er bijvoorbeeld een andere formulering of toedieningswijze gekozen. Dat leidt uiteindelijk tot een weloverwogen traject dat doorlopen wordt, er wordt niet alles getest met een formulering, en een dosering, we 'testen niet om te testen', in die zin hopen wij ook aan vermindering bij te dragen. In een dergelijk project voorstel is het wel zaak meer zicht te geven op "het weloverwogen traject" dat doorlopen wordt en niet te blijven steken in algemeenheden temeer daar *in vitro* u vrij ver bent "in het ontdekken van belangrijke zaken, of iets werkt en in welke *in vitro* doses".
- 5/U merkt ook op dat, mede door de uitkomsten uit dierproef 1 in te zetten, u verwacht minder dieren met het ziektemodel te gebruiken. De doelstelling van uw projectvoorstel is : Het doel van het huidige project is om antwoord te geven op de vraag of onze testcompound positieve effecten laat zien in het Hurler muis model specifiek voor de p.Trp402X mutatie. De vraag rijst nu bij de DEC-RuG of bijlage 1 überhaupt noodzakelijk is voor de beantwoording van deze vraag temeer daar u in bijlage 2 tevens voornemens bent tot bepaling van de optimale toedieningsroute en biodistributie van de nieuwe oligonucleotiden bij de Hurlermuis.

Laatste vragen:

- 1/Van Uw lijst handelingen maken ondermeer intravitreale, intrathecale en intracerebrale injecties deel uit. In geval van beide laatste toedieningswijzen is zelfs sprake van herhaalde toediening. Zouden in het licht daarvan neurologische verschijnselen, zoals ataxie, blindheid, parese en paralyse niet misstaan als humane eindpunten.

- 2/U geeft aan dat de overlevingskans van Hurlermuizen tot 30 weken rond de 90% ligt (Wang et al., 2010). Treedt uitval van de 10% der dieren eerder dan 30 weken leeftijd op door spontane sterfte of wordt dit ondervangen door het bereiken van een humaan eindpunt? Zo ja, welk humaan eindpunt?
- 3/U heeft niet intramusculaire toediening als aantrekkelijk translationele toedieningswijze opgenomen, nietwaar?
- 4/Van welk orgaan verwacht U eigenlijk de belangrijkste bijdrage aan het ziektebeeld gezien de locale toediening?
- 5/Injectie van oligonucleotiden in een orgaan hoeft natuurlijk niet te leiden tot een effect in het gehele betreffende orgaan, maar er zou sprake kunnen zijn van onwerkzaamheid van een lokaal oligonucleotidendepot. In hoeverre heeft U dit reeds onderzocht in weefselweek en/of orgaanpreparaten/organoiden?
- 6/Het heeft er alle schijn van dat het voor de hand ligt te veronderstellen dat de toediening van de oligonucleotiden met name kans van slagen heeft bij systemische werkzaamheid na al dan niet systemische toediening. In Uw go/no go schema wordt de indruk gewekt dat U de werkzaamheid van alle toedieningsvormen wilt gaan testen. Zou het ook een mogelijkheid zijn een go/no go schema te ontwerpen, waarin de werkzaamheid van systemische toediening als uitgangspunt wordt genomen al dan niet naast een toediening in het centrale zenuwstelsel?

- Datum antwoord: **27-02-2017, 07-03-2017, 13-03-2017**

- Verstrek(e) antwoord(en):

- 1/ Op voorhand sluiten we herhaling en duplicering niet expliciet uit, het traject volgt elkaar op. We kunnen dezelfde stof testen, in twee modellen, dat is het hele doel erachter. Eerst opname en distributie bepalen dmv fluorescentie; vervolgens, indien onze teststof op de juiste plek komt, gaan we in een ziekte model kijken.
- 2/ Lokalisatie in de celkern van de teststof is in het Hurler model niet nodig bij deze techniek (over het algemeen wel bij oligonucleotides). Plasmalevels bepalen is hier slechts een onderdeel van meerdere metingen, we willen ook meten of het werkt. We hebben dit aangegeven onder A:
Hoeveelheid teststof in het plasma na toediening (voor PK doeleinden en translatie naar klinische doses);
Macroscopische lokalisatie na toediening (hoeveelheid fluorescentie per orgaan);
Nucleaire lokalisatie van de stof m.b.v. confocale microscopie;
Het is essentieel dat plasma wordt gemeten zodat we ook voor de klinische fase iets hebben aan de data, in de kliniek kunnen we geen organen isoleren om levels te bepalen. Hier zijn we afhankelijk van plasmawaarden en zullen daarom in onze datasets ook effecten aan plaswaarden proberen te koppelen zodat we hier humaan een uitspraak kunnen doen over de optimale klinische dosis.
- 3/ Er zijn bij onze type oligonucleotides met specifieke chemische modificaties weinig tot geen toxische effecten, de betreffende referentie spreekt over LNA (welke zeer sterk binden aan (serum) eiwitten). De door ons gebruikte oligo's zijn minder immunogeen, hebben een lagere eiwitbinding en worden relatief makkelijker afgebroken dan de LNA variant. Dit type oligo wordt momenteel in diverse klinische studies getest: Zie onder andere: Viney, N. J., van Capelleveen, J. C., Geary, R. S., Xia, S., Tami, J. A., Yu, R. Z., ... Tsimikas, S. (2016). Antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein(a) in people with raised lipoprotein(a): two randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trials. *The Lancet*, 388(10057), 2239–2253. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31009-1](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31009-1).
- 4/ Dat is aangepast naar "In sporadisch gevallen is het mogelijk dat meervoudige doseringen tot bijvoorbeeld ontstekingen leiden, zodra er een zichtbare ontsteking is of als de dieren > 20% afnemen in gewicht in een week tijd worden de dieren uit de proef genomen."
- 5/ We gaan ongeveer 4 muizen per tijdstip doseren en onderzoeken, dat is uit een internationale referentie voortgekomen getal (Ette, E. I., Kelman, A. W., Howie, C. A., & Whiting, B. (1995). Analysis of animal pharmacokinetic data: Performance of the one point per animal design. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 23(6), 551–566. <http://doi.org/10.1007/BF02353461>). Verder verwachten we 2-3 groepen nodig te hebben om een optimale formulering te definiëren, en we hebben 3 doseringslevels en we verwachten 5-6 tijdstippen nodig te hebben voor een kinetiek inschatting. In totaal komen we hiermee op 3 (formuleringen x 4 muizen) + 6 (tijdstippen op de beoogde dosering) x 4 (muizen) dan 4 (muizen) x 4 (doseringen: 0, laag, midden hoog). Totaal komen we dan op 12+24+16 = 52 dieren. Omdat we verwachten dat formuleringen vaak vrij standaard zijn (saline/PBS) en er soms minimale effecten te verwachten zijn en we een keuze theoretisch al kunnen maken vermoeden we toch met 40 dieren toe te kunnen komen. Dit is onder de statische onderbouwing in beide experimenten beschreven.
- 6/ Dank voor deze tip, er is geen enkele reden om de wildtypes in een andere leeftijdsrange te gebruiken, die worden van 10-30 ook gebruikt. Dat is aangepast.
- 7/ Dit is een goed punt, we zullen GAG in de urine meten. Echter de levels op orgaaniveau zijn bepalend. Het is op orgaaniveau (hersenen bijvoorbeeld) noodzakelijk om te bekijken of er verbeteringen plaatsvinden, dat is niet af te leiden uit urineniveaus.
- 8/ In vitro zijn we vrij ver in het ontdekken van belangrijke zaken, of iets werkt en in welke in vitro doses. Echter, of dat ook in zoogdieren vergelijkbaar is en wat voor plasmalevels en orgaanniveau's haalbaar zijn, zoals hier beschreven is absoluut noodzakelijk.
In vitro data wordt vaak verkregen door experimenten waarbij de celwand bijvoorbeeld doorlaatbaar gemaakt wordt met transfectie reagentia, dat is in vivo niet haalbaar (ivm tox). Voor de uiteindelijke vertaling naar zoogdieren is die data echter zeer noodzakelijk.
Ook hebben we aangegeven dat in het algemeen (3.a) er veel bekend is over oligonucleotiden en dat ze relatief veilig zijn, echter iedere oligonucleotide wordt specifiek ontwikkeld en heeft daardoor zijn eigen benadering nodig. Om dan tot het uiteindelijke doel te komen is de huidige aanvraag noodzakelijk.
Enkele referenties als bijlage bijgesloten dat oligo's goed bestudeerd moeten worden, alleen in vitro data is niet goed genoeg. Juliano, R. L. (2016). The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, (16), gkw236. <http://doi.org/10.1093/nar/gkw236>, Levin, A. A. (2017). Targeting Therapeutic Oligonucleotides. *The New England Journal of Medicine*, 376(1), 86–88. <http://doi.org/10.1056/NEJMcibr1613559>
- 9/ De NTS is wat eenvoudiger geschreven.

Antwoorden vervolgvragen:

1/De aanvrager is van mening dat het doen van onderzoek naar verschillende toedieningswijzen noodzakelijk is omdat de ziekte van Hurler in allerlei organen effecten kan hebben. Hierbij kunnen lokaal hogere concentraties andere effecten tonen dan systemische toedieningen. Omdat we in vitro weten dat onze stof werkt willen we de mogelijkheid vragen om dit via meerdere toedieningswijzen toe te dienen aan muizen. De humane eindpunten zijn per toediening weergegeven. Zie de tabel hieronder:

Nr.	Aard	Duur (Min)	Frequentie	Ongeriefsinschatting	Humane eindpunten
Toedieningswijzen					
1	IV injectie	2	1-28	2-3	De verwachting is bij herhaaldelijk injecteren dat er geen effecten te zien zullen zijn. Indien dieren een hematoom ontwikkelen door veelvuldig aanprikken zullen we de dieren offeren.
2	Intranasaal doseren	1	1-28	3	Dit gebeurt onder anesthesie en de stof wordt toegediend via de 'eigen' ademhaling, we verwachten hier geen humaan eindpunt mee te bereiken. Indien een dier onverhoopt in ademnood komt zullen we de dosering stoppen en het dier bij laten komen en later nogmaals doseren. Indien we daar hetzelfde zien zullen we het dier uit de proef nemen.
3	Subcutaan injectie	1	1-28	2-3	Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Indien we meerdere injecties toepassen zal
					iedere volgende injectie op een andere zijde (links of rechts) worden gezet.
4	Long toediening	1	1-28	2-3	Dit is een toediening via een nebulizer en hier hebben we goede ervaringen mee. We verwachten hier geen uitval noch een humaan eindpunt.
5	Intravitreaal	1	1	3	Dit is een eenmalige toediening onder anesthesie, hier verwachten we door de frequentie geen humane eindpunten. Indien er een infectie optreedt in het oog zal het dier onmiddellijk worden geofferd.
6	Intracerebrale injecties	3	2	3	Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in de hersenen te vinden.
7	Intrathecale injecties	3	2	3	Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in het ruggenmerg te vinden.
Andere technieken					
8	Wegen	1	1-28	2	Geen humaan eindpunt.
9	Beeldvorming	1	1-28	2	Geen, dit is het imago onder anesthesie.
10	Anesthesie	1	4-8	2	Geen, echter anesthesie in het algemeen kan voor ademhalingsproblemen zorgen tijdens de anesthesie. Afhankelijk wat er gebeurt kan de hoeveelheid O ₂ iets worden aangepast. Na afloop zal de muis rustig bijkomen, de verwachting is niet dat hierbij een humaan eindpunt optreedt.

2/Dat klopt, dit zijn indicatieve metingen, omdat de ziekte van Hurler op zoveel

plaatsen in het organisme effecten kan hebben is alleen het meten van GAG in urine niet toereikend. Daarnaast bestaat het vermoeden dat een meetbare verandering van GAG levels in Urine na interventie lastig te behalen is, al zijn we het met de DEC eens dat dit ook de voorkeur heeft, zeker voor de translatie naar de kliniek. Een correlatie tussen urine waarden en bepaalde mate van herstel, bereikt door onze therapie, is nog niet bekend. Het is meer waarschijnlijk dat onze therapie lage levels van Idua eiwit kan herstellen – welke voornamelijk op moleculair, biochemisch ofm.b.v .histologische assays bepaald kan worden. Hiervoor hebben we weefsels nodig. Juist door het combineren van verschillende functionele / semi-functionele assays op weefsels van hetzelfde dier zijn we tot een vermindering van het beoogde aantal muizen gekomen. (zie D)

3/ Het bepalen van weefselconcentraties is juist dan zinvol, alleen op die manier kunnen we conclusies trekken uit bijvoorbeeld een verschil in systemische of lokale toediening en de concentratie in een orgaan waar we wel of geen resultaat zien.

4/ We zoeken in de aanvraag bepaalde vrijheidsgraden omdat we op zoek zijn naar de beste toedieningswijze/toedieningsaard van ons nieuwe product. In vitro weten we dat deze techniek werkt en hebben we een aantal kandidaat stoffen gevonden. De translatie naar in vivo is essentieel omdat de distributie en opnamen van oligonucleotiden in vivo anders zijn dan in vitro. In vitro wordt vaak een transfectie reagent gebruikt, in vivo kunnen we die niet gebruiken door hun hoge mate van toxiciteit, daarom willen we onderzoeken wat in vivo de beste toedieningswijze is. Daarbij starten we basaal: zien we een verschil in lokale of systemische toediening? Zien we een verschil tussen verschillende formuleringen? Ook hierbij is het noodzakelijk dat we hier onderzoek kunnen doen teneinde ons product verder te ontwikkelen. Het kan voorkomen dat we bijvoorbeeld een goed werkend product hebben waarbij we willen bestuderen of een slow-release formulering uiteindelijk lokaal/of systemisch (dat willen we onderzoeken) nog betere effecten laat zien. Het weloverwogen traject ontwikkelt zich tijdens de medicijnontwikkeling, niet iedere stap wordt van tevoren uitgeschreven, er is geen wet van meden en perzen.

o In aanvulling hierop, om uiteindelijk een product geregistreerd te krijgen is het verkrijgen van deze data essentieel. De EMA geeft aan dat er geen consistentie is in het veld, echter wel dat het noodzakelijk informatie op kan leveren voor de rest van het dossier. (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002771.pdf) (zie 3.4.1.)

5/ U heeft gelijk, voor het beantwoorden van de vraag of onze testcompound positieve effecten laat zien in het Hurler muis model, hebben we de Hurler muis nodig. Vooraf vinden wij het essentieel om te weten of onze stof bij de beoogde organen komt. We meten daarbij de fluorescentie in een fluorescente muis. Indien we lokaal geen effecten zien op fluorescentie dan hoeven we geen experiment uit te voeren met het Hurler muis model. Omdat dit laatste model in potentie een hogere kans op ongerief heeft hebben we deze route gekozen. Hiermee doen we relatief meer studies met het fluorescente model en minder met het Hurler model. De eerste is echter een veel nauwkeuriger en bovendien snellere meting en essentieel voor de selectie van onze stof in ons uiteindelijke ziektemodel. Bijlage I biedt ons de mogelijkheid relatief snel veel te testen, waarbij bijlage II meer voor een fase verder in het onderzoek is waarbij we ons richten op de effectiviteit (zie 3.4.3).

Laatste antwoorden:

1/Na intern beraad kiezen wij er voor om slechts eenmaal deze invasieve injecties toe te dienen, ook voegen wij deze specifieke in de DEC aanvraag toe, niet alleen in het werkprotocol:

Intravitreal: deze toedieningstechniek zal maximaal eenmaal gedaan worden, zodra bij de injectie al duidelijk is dat het niet goed gaat, als het glasvocht er bijvoorbeeld uit loopt dan wordt het dier onmiddellijk geofferd. Komen we tijdens de dagelijkse controles erachter dat dieren blind raken dan nemen we de dieren uit voorzorg uit de proef;

Intrathecaal: deze toedieningstechniek zal maximaal eenmaal gedaan worden, hier kunnen we na het ontwaken uit narcose onmiddellijk waarnemen of een dier niet goed geïnjecteerd is. Zodra we tekenen van (geheel of gedeeltelijke) verlamming constateren dan wordt het dier geofferd;

Intracerebraal: deze toedieningstechniek zal maximaal eenmaal gedaan worden, hier kunnen we na het ontwaken uit narcose onmiddellijk waarnemen of een dier niet goed geïnjecteerd is. Zodra we tekenen van geheel of gedeeltelijk verlamming constateren dan wordt het dier geofferd, indien we ataxie constateren zullen we de dieren intensiever dan dagelijks volgen, indien wij het idee hebben dat het dier meer dan matig ongerief ervaart zullen het afvoeren.

Humane eindpunten worden ook bij de dagelijkse verzorging gemonitord, bijgevoegd een lijst die binnen ons bedrijf wordt gehanteerd. We werken louter met bevoegd en bekwaam personeel dat zich houdt aan de interne afspraken. Bijgevoegd daarom onze instructie dagelijkse controles

2/ Volgens het paper is dit spontane sterfte, binnen de USA wordt echter minder naar humane eindpunten gekeken, we zullen hier zelf op toezien en indien we een verandering in gedrag waarnemen zullen we de proefdierdeskundige/13f3a3/dierenarts inschakelen.



6/ Onderzoek met oligonucleotiden heeft aangetoond dat na systemische toediening de oligonucleotiden met name naar de lever en nieren gaan (Juliano, 2016) . Daarnaast kunnen oligonucleotiden vanwege hun grootte de bloed-brein en bloed-retina barrière niet passeren (Evers et al, 2014). Eigen onderzoek en (Fey et al, 2014) heeft aangetoond dat lokale toediening in de longen een zeer efficiënte opname in de longcellen laat zien vergeleken met intraveneus of andere systemische toedieningsvormen. Voor ons zijn dat redenen om niet te willen starten met een systemische toediening, maar ons te richten op alle facetten. **Referenties:**

-Clarke LA. Mucopolysaccharidosis Type I. 2002 Oct 31 [Updated 2016 Feb 11]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

-Østergaard, M. E., Southwell, A. L., Kordasiewicz, H., Watt, A. T., Skotte, N. H., Doty, C. N., ... Seth, P. P. (2013). Rational design of antisense oligonucleotides targeting single nucleotide polymorphisms for potent and allele selective suppression of mutant Huntingtin in the CNS. *Nucleic Acids Research*, 41(21), 9634–9650. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt725>

-Gérard, X., Perrault, I., Munnich, A., Kaplan, J., & Rozet, J.-M. (2015). Intravitreal Injection of Splice-switching Oligonucleotides to Manipulate Splicing in Retinal Cells. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, 4(9), e250. <http://doi.org/10.1038/mtna.2015.24>

-Fey, R. a, Templin, M. V, McDonald, J. D., Yu, R. Z., Hutt, J. a, Gigliotti, A. P., ... Reed, M. D. (2014). Local and systemic tolerability of a 2'-O-methoxyethyl antisense oligonucleotide targeting interleukin-4 receptor-α delivery by inhalation in mouse and monkey. *Inhalation Toxicology*, 26(8), 452–63. <http://doi.org/10.3109/08958378.2014.907587>

-Juliano, R. L. (2016). The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, (16), gkw236. <http://doi.org/10.1093/nar/gkw236>

-Evers, M. M., Tran, H.-D., Zalachoras, I., Meijer, O. C., den Dunnen, J. T., van Ommen, G.-J. B., ... van Roon-Mom, W. M. C. (2014). Preventing formation of toxic N-terminal huntingtin fragments through antisense oligonucleotide-mediated protein modification. *Nucleic Acid Therapeutics*, 24(1), 4–12. <http://doi.org/10.1089/nat.2013.0452>

- **De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag**

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **Ja**
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning. **Nieuwe aanvraag**
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **N.v.t.**

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De subdoelen lijken niet allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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

Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RuG signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. **De doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.**

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel van dit project is om na te gaan of de beschreven testcompounds positieve effecten laten zien in het Hurler muis model specifiek voor de p.Trp402X mutatie.

Het uiteindelijke doel is om een betere behandeling van de ziekte van Hurler te ontwikkelen.

Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op fundamenteel en translationeel onderzoek m.b.t. de hierboven beschreven (directe) doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele/translationele project zijn de proefdieren, en mensen met de ziekte van Hurler.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast door genetische modificatie, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en ongerief ondergaan als gevolg van het toedienen van teststoffen en bloedafnames. Aan het einde van de proef zullen de dieren opgeofferd worden.

Waarden die voor mensen bevorderd worden: een potentieel betere behandeling van de ziekte van Hurler.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Voor zover de DEC de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu te betrekken. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RuG signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*). **De DEC is ervan overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstelling en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling op basis van met name bijlage 2 in het kader van het project.**

Welzijn dieren

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

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

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. **De DEC heeft zich ervan verzekerd dat huisvesting en verzorging volgens de richtlijn gebeurt. Dit op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 van de ondertekening van de aanvraag en punt F van de bijlage.**

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **Dit is goed ingeschat. De DEC vertrouwt erop dat**

de aanvrager al het mogelijke zal doen om het ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*). **De integriteit van het dier wordt aangetast door genetische verandering, het toedienen van teststoffen en bloedafnames. Aan het einde van de proef zullen de dieren opgeofferd worden.**
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **Naar de mening van de DEC zijn de criteria voor humane eindpunten in deze aanvraag voldoende beschreven.**

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Biodistributie, farmacokinetiek en daarmee de effectieve dosering van de teststoffen zijn in vitro niet na te bootsen.**
15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **Naar de mening van de DEC is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat, zulks mede gebaseerd op de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties en power analyses.**
16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.**
17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe. **NvT (betreft geen wettelijk vereist onderzoek)**

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*). **In onderhavige projectaanvraag worden beide geslachten gebruikt. De onderzoeker heeft naar de mening van de DEC deze keuze in de projectaanvraag voldoende onderbouwd.**

Alhoewel de DEC-RUG vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **Naar de mening van de DEC is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.**
20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **N.v.t.**

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?
Naar de mening van de DEC is zulks het geval.

D. Ethische afweging.

*Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "**Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom**", dat gericht is op de verbetering van de behandelmethoden van patiënten met het Hurlersyndroom het matige ongerief, dat de muizen wordt aangedaan in het onderhavige project?*

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **matig nadeel.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **substantieel voordeel.**

Algemeen: **vergroting van medische kennis met betrekking tot de behandeling van het Hurlersyndroom.**

*De DEC-RuG is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project "**Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom**" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door het al dan niet herhaald toedienen van een oligonucleotide, herhaalde bloedafname, eventuele herhaalde anesthesie en de opoffering aan het eind van de proeven. Dit zal ook repercussies hebben op hun natuurlijke gedrag.*

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot een relevante uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over het behandelen van het syndroom van Hurler. Voor de betreffende patiënten is verbetering van hun welzijn en mogelijk uitzicht op herstel van groot belang. Dit verhoogt hun levensverwachting en geeft een betere kwaliteit van leven. Tevens zal de kwaliteit van leven van hun naasten verbeterd worden.

Vandaar dat de DEC-RuG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk, translationeel als vanuit maatschappelijk oogpunt, van substantieel belang acht. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het welzijn van de dieren te bevorderen, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

*De DEC-RuG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project **"Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom"**, dat gericht is op de verbetering van de behandeling van het syndroom van Hurler, de opoffering en het matige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project bevestigend.*

Hoewel de DEC-RuG de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

*De DEC-RuG is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project **op basis van met name bijlage 2**. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.*

De DEC-RuG is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC-RuG is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

*Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-RuG de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel **"Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom"** als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RuG derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.*

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

Opmerking: Gezien het onder 3.2 in het projectvoorstel beschreven doel lijkt bijlage 1 niet strikt noodzakelijk voor het behalen van dit doel vermits deze bijlage 1 noodzakelijk is in het kader van toekomstige geneesmiddelregistratie.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

2. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 12 april 2017 15:52
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: NTS aanvraag AVD9070020171164
Bijlagen: format_nts-Hurlerv12_vragenCCd.doc

Let op, in de bijlage van deze e-mail, verzonden door [REDACTED] is een macro aangetroffen. Macro's kunnen misbruikt worden om malware op uw systeem te installeren. Open de bijlage alleen als de e-mail afkomstig is van een door u vertrouwde afzender.

Indien dit niet het geval is dient u deze e-mail direct te verwijderen zonder de bijlage te openen.

DICTU Servicedesk

LS,
Excuses, dat heb ik over het hoofd gezien.
Met vriendelijke groet/Best regards,
[REDACTED]



[REDACTED]
[REDACTED]
InnoSer Nederland BV / InnoSer Laboratories BV
Runderweg 6 Zernikedreef 9
8219 PK 2333 CK
Lelystad Leiden
[REDACTED]
[REDACTED]

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: woensdag 12 april 2017 15:49
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: NTS aanvraag AVD9070020171164

Geachte [REDACTED]

Bedankt voor de documenten, maar in de nieuwe NTS staat nu 1760 muizen in totaal: 800 wildtype muizen 1200 Hurler muizen. Het zou 2000 muizen in totaal moeten zijn.

Wilt u dit aanpassen?

Alvast dank.

Met vriendelijke groet,

██████████
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: ██████████
Verzonden: woensdag 12 april 2017 15:42
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: NTS aanvraag AVD9070020171164

Let op, in de bijlage van deze e-mail, verzonden door ██████████ is een macro aangetroffen. Macro's kunnen misbruikt worden om malware op uw systeem te installeren. Open de bijlage alleen als de e-mail afkomstig is van een door u vertrouwde afzender.

Indien dit niet het geval is dient u deze e-mail direct te verwijderen zonder de bijlage te openen.

DICTU Servicedesk

Ls,
Hartelijk dank voor de telefonische terugkoppeling, bijgevoegd de geupdate versies,
Met vriendelijke groet/Best regards,

██████████



██████████
██████████
InnoSer Nederland BV / InnoSer Laboratories BV
Runderweg 6 Zernikedreef 9
8219 PK 2333 CK
Lelystad Leiden

██████████
██████████

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: dinsdag 11 april 2017 15:38
Aan: ██████████
CC: ██████████
Onderwerp: NTS aanvraag AVD9070020171164

Geachte ██████████

De CCD heeft uw aanvraag met nummer AVD9070020171164 en titel 'Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van de ziekte van Hurler' besproken.

Voordat we de beschikking naar u toe kunnen sturen hebben we een nieuwe versie van de Niet-technische samenvatting nodig waarin minder vaktechnische woorden worden gebruikt. De NTS moet begrijpelijk voor het brede publiek zijn. Woorden zoals: oligonucleotiden, RNA, mucopolysacharidose, glucosaminoglycanen, immunogeniciteit enz. zijn te technisch voor het publiek.

Daarnaast schrijft u onder kopje 4.2 Vermindering: 'Er worden altijd het maximale aantal dieren gebruikt dat nodig is'. Bedoelt u niet 'het minimale aantal dieren'? In de wet staat dat het minimum aantal dieren nodig om een uitspraak te kunnen maken mag worden gebruikt.

Graag ontvangen we een nieuwe NTS die op een meer voor de leek begrijpelijke manier is geschreven en waarin de hierboven genoemde zin is aangepast.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort totdat we de nieuwe NTS hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,


Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

[Click here to report this message as SPAM](#)

-- Powered by ATERA Networks --



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Innoser Laboratories BV

Zernikedreef 9
2333 CK LEIDEN


**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
AVD9070020171164
Bijlagen
1

Datum 12 april 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 23 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom." met aanvraagnummer AVD9070020171164. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 12 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft een aangepaste versie van de Niet-technische samenvatting ingediend en het aantal dieren in bijlage dierproeven 2 aangepast.

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.

Met het oog op artikel 10a1, lid 2 van de wet, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom." starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 april 2017 tot en met 31 maart 2022. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Rug/ UMCG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 maart 2017. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:

12 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD9070020171164

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 nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. 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).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Datum:
12 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD9070020171164

Algemeen Secretaris

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: Innoser Laboratories BV
Adres: Zernikedreef 9
Postcode en plaats: 2333 CK LEIDEN
Deelnemersnummer: 90700

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 april 2017 tot en met 31 maart 2022, voor het project "Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom." met aanvraagnummer AVD9070020171164, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Rug/ UMCG. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] and operations.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 maart 2017, ontvangen op 23 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 12 april 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Fluorescentie studie in de wildtype muis.				
	Muizen (Mus musculus) /	800	100% Matig	
3.4.4.2 Doseerstudie Hurler muis.				
	Muizen (Mus musculus) / Idua-W392X muis	1.200	100% Matig	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

Aanvraagnummer:
AVD9070020171164

In artikel 10, lid 1 sub a 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 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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD9070020171164

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 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

Aanvraagnummer:

AVD9070020171164

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 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 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.