

	Inventaris Wob-verzoek W17-09								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017846								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud			x					
6	DEC-advies			x					
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
9	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
10	Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw			x					
11	Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw			x					
12	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
13	Aanvullende vraag			x			x	x	
14	Reactie aanvullende vraag			x			x	x	
15	Advies CCD		x						x
16	Beschikking en vergunning			x			x	x	



01 FEB. 2017

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 10800
☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen
- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- | | |
|---|--------------------------------------|
| Naam instelling of organisatie | Universiteit Utrecht |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | |
| KvK-nummer | 30275924 |
| Straat en huisnummer | Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht |
| Postbus | 12007 |
| Postcode en plaats | 3501AA Utrecht |
| IBAN | NL27INGB0000425267 |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | Universiteit Utrecht |
- 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 | | ☐ Dhr. ☒ Mw. |
| Functie | | |
| Afdeling | Biofarmacie, faculteit betawetenschappen | |
| Telefoonnummer | | |
| E-mailadres | | |
- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
- | | | |
|-----------------------------|--|--|
| (Titel) Naam en voorletters | | ☐ Dhr. ☐ Mw. |
| Functie | | |
| Afdeling | | |
| Telefoonnummer | | |
| E-mailadres | | |

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 4 - 2017
- Einddatum 1 - 4 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Nieuwe medicijnen met vetoplosbare geneesmiddelen voor cholestatistische patiënten
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Utrecht
- Postadres Postbus 85500 3508 GA Utrecht
- E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.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

[Redacted signature area]

Utrecht
 24-01-2017

[Redacted signature area]



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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- | | |
|--|---|
| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | <input type="text" value="10800"/> |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | <input type="text" value="Universiteit Utrecht"/> |
| 1.3 Vul de titel van het project in. | <input type="text" value="Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients"/> |

2 Categorie van het project

- | | |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.

<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | ☒ 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.

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.

More and more new medicines have an active pharmaceutical ingredient (API) that is lipophilic and therefore barely soluble in water. This limits the oral bioavailability of the API, since it needs to be dissolved in the fluids of the intestinal lumen. The body has developed a mechanism to be able to absorb lipophilic components, like vitamins and food. This mechanism is a series of processes that eventually result in the packing of lipophilic components into mixed micelles in the lumen of the intestine [1]. Mixed micelles are self-assembled structures made of bile acids, monoglycerides and fatty acids liberated from triglyceride [1]. Lipophilic drugs that are given orally need the same mechanism to be absorbed into the body. The formation of these mixed micelles is essential for absorption of these lipophilic drugs by the human body [1, 2].

The ingredients that form the mixed micelles come from bile. Bile contains bile acids, phospholipids and cholesterol. Bile acids have surfactant properties, which is essential for forming micelles. Micelles are so important, because by solubilising lipophilic molecules, they can provide a higher concentration of the lipophilic drugs in the aqueous phase before being taken up by the epithelium. Patients with cholestasis lack bile or produce bile without proper surfactant properties. Therefore those patients can only absorb lipophilic drugs and vitamins at low degree. The cholestasis causes malabsorption of lipophilic drugs and vitamins in the patients and this leads to deficiencies.

A well-known example of a cholestasis-caused deficiency is vitamin K deficiency. A deficiency of vitamin K may result in spontaneous life-threatening hemorrhages [3]. Vitamin K deficiency frequently occurs in neonates due to limited transport of vitamin K through the placental barrier and low concentration in breast milk [4]. For this reason newborns receive vitamin K prophylaxis directly after birth and during their first 3 months when they are breastfed. The formulation of the prophylaxis is vitamin K dissolved in arachis oil. For cholestatic patients it is impossible to absorb vitamin K from this formulation since they have no bile. Another formulation with vitamin K is Konakion® mixed micelles (MM) Paediatric, which is a formulation composed of vitamin K, egg phosphatidylcholine (EPC or lecithin) and glycocholic acid (a bile acid). It is indicated for both the prophylaxis and treatment of vitamin K deficiency bleeding in newborns as well as adults. Although Konakion® mixed micelles (MM) can be used for oral delivery, the uptake of vitamin K from those mixed micelles was both low and unreliable for newborns with cholestasis [5]. One of the possible reasons is that the bile salts present in the formulation have a carboxylic acid group with a pKa of 3.8, which ensures a good colloidal stability of the mixed micelles above pH>~4 [6]. However, at low gastric pH mixed micelles are unstable and form large aggregates because of the protonation of the carboxylate group of bile salts, eventually causing coalescence of the formulation [7]. Because of the low level of endogenous bile salts in cholestatic patients, the coalesced vitamin K cannot be re-solubilized once in the intestine.

Mixed micelles have been extensively studied as an oral delivery system for lipophilic drugs such as silybin [8] streptomycin and gentamycin [9]. Besides Konakion® mixed micelles, several successful pharmaceutical products have been marketed as mixed micelles, like Valium MM (Diazepam) and Fungizone for infusion (Amphotericin B). These are all formulations meant for injection. Unfortunately, as discussed above, these two formulations (Valium MM (Diazepam) and Fungizone (Amphotericin B)) are unstable in the stomach and therefore not suitable for oral delivery to cholestatic patients, which may explain why they are not suggested for oral delivery in their Drug Instructions.

Concluding from these examples, lipophilic drugs can very well be packed in a delivery system like mixed micelles. Nonetheless, the current mixed micellar formulations are unsuitable for oral delivery, even

though oral delivery has been the preferred route of administration for many years. On top of that the inclusion of bile salts in the formulation has not yet proven to be helpful in the treatment of cholestatic patients.

Our group can make delivery systems based on mixed micelles that are stable for oral delivery using a new approach. This new approach is based on making the micelles stable in the gastric pH. This can be done by pegylating bile salts, which makes them more stable. Another method is using bile salts that are deprotonated by pH>2 or another method is to make mixed micelles from not two, but more different bile salts, which will make them more stable as well. Such formulations are exceptionally promising for the oral delivery of lipophilic drugs.

So far, a few formulations, which have a similar size as natural mixed micelles (nano scale) and are stable at low gastric pH, have been developed by *in vitro* testing. This testing includes the uptake and transport profile of lipophilic drugs, like vitamin K, with Caco-2 cells and organoids as a model for the intestinal epithelium. Fasted state simulated gastric or intestinal fluids (FaSSGF and FaSSIF) without bile salts are used to resemble fluids found in the gastro-intestinal (GI) tract and to mimic the pathological condition of cholestasis with Caco-2 cell as a model for *in vivo* studies [7].

This approach will be transferred to other lipophilic vitamins (A, E, D) soon. Right now we have four suitable formulations for vitamin K that will be tested. If some of these formulations show proper absorption in the rats, this project will focus further on whether this approach can be applied to other lipophilic vitamins. This leads to a maximum of 15 formulations in 5 years: we estimate two formulations for each vitamin ($3 \times 2 = 6$) and 1 formulation for a combining product containing all 4 lipophilic vitamins. That gives a total of 11 formulations. Unforeseen results could lead to retrieval of a formulation. Therefore an extra 4 formulations are added. This way 15 formulations is absolutely the maximum number of formulations that will be tested.

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?

Objective

The objective of this project is to develop new delivery systems for lipophilic drugs that are based on the naturally occurring mixed micelles but are stable at low gastric pH to deliver lipophilic drugs orally for cholestatic patients.

Formulations, that we developed, are based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants that meet the following requirements will be selected for further *in vivo* studies: 1. have a similar average size as natural mixed micelles (nano scale below 100 nm), 2. be stable at low gastric pH, 3. have comparable uptake efficiency and permeation to Konakion MM through Caco-2 cell monolayers and organoids from small intestine.

Feasibility

Besides the vitamin K formulation, it will be very feasible to develop new formulations for the other lipophilic vitamins as well. Our research group actually has a lot of experience in doing *in vitro* and *in vivo* research in the field of nanomedicine. Bile duct ligated rats have been used in our group before to study the bioavailability of lipophilic drugs loaded in polymeric micelles. Skilled personnel will participate in conducting procedures on animals or will acquire the necessary skills beforehand. We have access to the different instruments (UPLC, LC-MS, tissue homogenizer and IVIS Spectrum BL High-Throughput *In Vivo* Optical Imaging System) that will be needed to quantify the amount of drug from the blood or tissue samples.

3.3 Belang

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

For scientific interest:

Delivering lipophilic drugs is still an area in which researchers struggle to find suitable delivering systems. Therefore, finding new systems will give researchers an extra tool to develop new formulations with lipophilic drugs, which are not only suitable for cholestatic patients.

Societal interest:

Formulations for (lipophilic) drugs which are simple, have low production costs and are easy to administer (orally delivered) are preferred for patients. A novel delivery system containing mostly natural components which can remain stable in the stomach will have a huge market, due to the fact that natural components will be safe to administer. On top of that those formulations are urgently necessary currently especially for patients with cholestasis.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Since the objective is to develop a novel delivery system of lipophilic drugs for cholestatic patients, the strategy will be to study *in vivo*, under conditions where bile doesn't reach the intestine: absorption and intestinal uptake/transport mechanism and distribution by gaining pharmacokinetic parameters such as maximum plasma concentration (T_{max}), area under the curve (AUC) and calculating amount of drugs extracted from different parts of the intestine respectively.

Animal studies will only be done when *in vitro* models are not sufficient or already done. This means that we will only test formulations *in vivo* when they appear promising based on *in vitro* experiments, i.e. when they are stable at low pH and upon exposure to fasted state simulated gastric or intestinal fluids (FaSSGF and FaSSIF), and show efficient cellular uptake and transport studied with a Caco-2 cell model.

So, after testing formulations *in vitro*, promising formulations will be tested on pharmacokinetic parameters and on distribution of the particles.

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

1. Influence of newly developed delivery systems on the absorption of orally administered lipophilic drugs.

The objective of this type of experiment is to determine the pharmacokinetic profile of a new formulation under conditions with and without endogenous bile in the intestine. Rats will therefore be divided in two groups and will be randomly assigned to undergo either bile duct cannulation or a sham operation. Every rat will also receive jugular vein cannula to facilitate blood sample drawing.

Administration of the formulation will take place a day after surgery. Subsequently, blood samples will be taken at different time points.

To calculate the bioavailability and compare with previous data from transport studies pharmacokinetic parameters like, amongst others T_{max} and AUC, will be determined.

This type of animal experiment will further be called pharmacokinetics study. During the project duration different delivery systems and different API's will be tested.

2. Distribution of the new delivery system and of the drug alone in the intestine.

The objective of this type of experiment is to determine the distribution of the new delivery systems and compare this to the distribution profile of the API.

To be able to 'see' a new delivery system like mixed micelles, mixed micelles will be labelled with a fluorescent probe, which can be used as tracing indicator. The distribution of the fluorescent probes can be seen using the IVIS Spectrum BL High-Throughput *In Vivo* Optical Imaging System.

The fluorescently labelled formulation will be administered orally to fasted rats. In order to locate the

exact position of mixed micelles in the entire GI tract, four hours after administration of the drug the animals will be euthanized. The GI tract is dissected into segments and observed using the IVIS imaging system. The fluorescence intensity in each GI segment is quantified and compared [10]. At the same time, to quantify the amount of absorbed lipophilic drug, the segments will be suspended in phosphate buffered saline and rapidly stored at -80 °C until analysis [11]. This type of experiment will further be called distribution study.

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.

After administrating a new formulation, the plasma-drug-concentration-time profile will be used to evaluate the bioavailability of different formulations. Besides the bioavailability, the main absorption site in the small intestine for drug loaded mixed micelles is also quite important to understand the mechanism of absorption. Both fluorescently labeled mixed micelles and vitamin K are determined in different parts of small intestine to confirm the major absorption site.

The coherence between these two types of experiments is that both experiments give information about kinetics and degree of absorption as well as the absorption site respectively for the lipophilic drug to be investigated. On top of that the distribution study can give an explanation for differences seen in the pharmacokinetics study. Information from both studies can be used to either optimize the formulation or further develop the formulation to eventually be used in human newborns.

Phasing the experiments is not quite applicable since both experiments will be conducted to give information about the same new formulation. However, it is practical to start with the pharmacokinetics study. In case the pharmacokinetic characteristics of a new formulation appear to be inappropriate and do not result in absorption at all, it is unnecessary to conduct the distribution study.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Pharmacokinetics study
2	Distribution study
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Nieuwe medicijnen met vetoplosbare geneesmiddelen voor cholestatische patiënten
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Cholestase, galzouten, gemengde micellen, pasgeborenen, vetoplosbare geneesmiddelen

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
	☐ 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)	Steeds meer werkzame stoffen (WS) van een medicijn zijn slecht wateroplosbaar en juist goed oplosbaar in vet. Dit remt de opname van dat medicijn vanuit het maagdarmkanaal. Het lichaam heeft voor het opnemen van vetoplosbare WS galzouten nodig. Galzouten vormen gemengde micellen (een soort minuscule bolvormige pakketjes) met de WS waardoor de stof kan worden opgenomen. Patiënten met cholestase produceren geen gal en kunnen daardoor vetoplosbare WS niet of nauwelijks opnemen. Om deze reden hebben die patiënten ook problemen met de opname van vetoplosbare vitamines, zoals vitamine K. Tekorten van vitamines kunnen leiden tot allerlei ziekten. Bijvoorbeeld bij pasgeboren baby's kan een gebrek aan vitamine K leiden tot ernstige stollingsproblemen, leidend tot onverwachte en vaak dodelijke
---	--

hersenbloedingen.

Cholestatische patiënten kunnen geholpen worden door een nieuw medicijn te maken waarbij de vetoplosbare WS worden 'verpakt' in galzouten. Een van de uitdagingen in ons onderzoek is het vinden van geneesmiddelsamenstellingen die stabiel zijn in de maag.

De doelstelling van dit project is het ontwikkelen van zulk soort nieuwe medicijnen. De doelgroep van dit project zijn cholestatische patiënten. De nieuwe medicijnen zijn bij voorkeur gemakkelijk toe te dienen (ook bij baby's) en bestaan vooral uit natuurlijke en semi-natuurlijke componenten. Met het gebruik van natuurlijke en semi-natuurlijke componenten wordt geprobeerd een zo veilig mogelijk product te maken.

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

Er zullen een aantal nieuwe medicijnen ontwikkeld worden met vetoplosbare WS. Eén daarvan zal in ieder geval een medicijn zijn met vitamine K voor baby's waarbij de gal niet in de darm terecht komt. Resultaten van dit project kunnen worden toegepast op andere slecht-wateroplosbare essentiële (voedings)stoffen en geneesmiddelen, ook voor volwassenen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Er zullen maximaal 1455 ratten gebruikt worden in 5 jaar.

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

De noodzakelijke operatie aan de proefdieren zal onder algehele anesthesie worden uitgevoerd, met pijnstilling na afloop. Desalniettemin valt te verwachten dat de dieren enige last en stress zullen ondervinden bij het ondergaan van de operatie en het via de mond toedienen van de medicijnen met een sonde.

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

Vrijwel alle dieren zullen in de categorie 'matig' ongemak vallen. In het ernstigste geval zou ongeveer 20% van de dieren kunnen lijden aan ernstig ongemak.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Een deel van de ratten wordt na afloop gedood om de WS te kunnen opsporen in de darm. Het andere deel zal na afloop ook gedood worden, omdat de omleiding van de galgang niet hersteld kan worden.

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.

De gekweekte darmcellen zijn geen volledige vervanging voor een darm, want de cellen kunnen de slecht wateroplosbare WS niet afgeven aan bloed of lymfe. Daarbij maken deze cellen geen slijmvlieslaag. De slijmvlieslaag zorgt ervoor dat opname anders kan verlopen.

4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal

Uitsluitend zullen medicijnen gebruikt worden die al uitgebreid en positief in de laboratoriumfase getest zijn op hun stabiliteit onder condities die heersen in de maag en darm; aangetoond onschadelijk zijn voor gekweekte darmcellen; en daarin opname en transport vertonen.

dieren wordt gebruikt.

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.

Er is gekozen voor ratten, omdat er veel kennis en expertise is met het werken met deze dieren. Daarnaast zijn er in literatuur al eerder modellen beschreven waarbij de galgang van ratten wordt omgeleid, waarbij binnen het vakgebied dit diermodel als meest geschikt wordt geacht voor de beoogde toepassing.

Er is gekozen voor het omleiden en niet het afbinden van de galgang, omdat afbinden voor meer ongemak zal leiden. Ratten hebben geen galblaas en daardoor zal afbinden sneller leiden tot ongemakken en ziektes zoals geelzucht.

Tenslotte, er zal een canule aangelegd worden in een ader, zodat verschillende bloedafnames gemakkelijk, zonder stress en pijnloos, gedaan kunnen worden.

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

Alle operaties worden onder volledige verdoving uitgevoerd; na de operatie wordt pijnstilling gegeven en zo nodig herhaald en de dieren zullen na de operatie en tijdens het experiment nauwkeurig worden gemonitord.

De dieren zullen moeten vasten, maar de duur hiervan zal zo kort mogelijk gehouden worden.

Indien dieren tekenen van ernstig ongerief (bijv. ernstige bloedingen) zullen vertonen, zullen ze worden gedood.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Pharmacokinetics study

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.

The objective of this type of experiment is to determine the pharmacokinetic profile of a new formulation under conditions with and without endogenous bile in the intestine. Therefore, animals need to be a model for patients where bile doesn't reach the intestine.

The animals will be divided randomly into two groups: a group receiving bile duct cannulation and a group receiving a sham operation instead. Both groups will be divided into three groups again (control vs two new formulations based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants). The sham operation group will serve as the control group.

The formulation will be given intragastrically to the animals and blood samples will be drawn at different time points.

Subsequently, the rats will be euthanized. Blood samples will be analysed by a previously validated method of analysis and pharmacokinetic parameters, like maximum plasma concentration (T_{max}) and area under the curve (AUC), will be calculated. Those pharmacokinetic parameters are the primary outcome parameters.

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.

Animals will start by having surgery with isoflurane anaesthesia (including adequate analgesia):

- Receiving bile duct cannulation or a sham operation as a control group. The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.
- Receiving jugular vein cannulation.

The bile duct cannulation will be done by making an incision below the ribcage. The bile duct will be located, isolated and cannulated. The cannula will be tunnelled to the back of neck to allow the bile to drip out of the animal [12]. The cannula will be sufficiently long enough to enable collecting the bile out of the cage. In the

2-day period between operation and experiment, the residue of bile in the intestine will be absorbed sufficiently by the intestine and therefore the influence of endogenous bile on the absorption of lipophilic drugs is absent.

The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.

For the jugular vein cannula an incision in the neck of the animal will be made through which the jugular vein can be located, isolated and cannulated. The cannula will be tunneled to the back of the neck. Cannulas will be filled and flushed with 10 IU/ml heparin in saline to maintain cannula patency.

Animals will rest and recover for 2 days with free access to food in a normal cage with sawdust. And post-operative analgesia (pain killer) will be provided.

After recovery the animals will be brought back to the standard animal rooms and fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage. The small intestines will be emptied from food during this period of fastening and influence of diet will thereby be minimised.

After treatment blood samples (max 8 ml / kg in total) will be drawn at different time points from the jugular vein cannula with minimal discomfort for the animal.

Bile duct cannulation (and not ligation) is chosen since this has the least impact on the animal: if a rat will be ligated, the bile can't flow away. Due to the fact that rats do not have a gallbladder, the bile will build up directly in the liver. This will make the rats uncomfortable and may possibly lead to diseases like jaundice. By putting a cannula in the bile duct the bile will freely drop away outside of the animal, leading to less discomfort for the animal. Another advantage of cannulation is that it will be possible to collect the bile and use this in *in vitro* experiments.

Since all animals need to receive surgery anyway to turn into a model where bile doesn't reach the intestine, it is decided to add a jugular vein cannula as well. This way there is no extra discomfort for the animal and frequent blood sampling will barely lead to discomfort for the animal.

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

In this type of experiment mixed micelles are tested on their absorption profile; outcome parameters are blood concentrations over time (C_{max} , area under the curve (AUC), $t_{1/2}$).

The group size is calculated using Lehr's formula based on data from pilot studies done in the past (standardized difference of 2 and SD of 1,3975), a power of 80% and a two-sided significance level of 0,05. This leads to a group size of 6-8 animals.

B. De dieren

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

Mature rats (6-8 weeks, 250g $\pm$ 25g) bred in Europe and of commercial origin will be used. Both male and female rats can be used. Rats are selected because they are the most widely used animals in biomedical research. Second of all, rats are the smallest animals by whom it will be possible to cannulate their bile ducts. Thirdly, rats with bile duct cannulation have often been used as a model where bile doesn't reach the intestine [12].

Number of animals

Experiments will be set up in a way to compare one or multiple new formulations with a control (a glycocholic acid/egg phospholipid based formulation that is already on the market). In one experiment, on average two new formulations will be compared to a control ($3 \times 8 = 24$ animals). All new formulations based on different lipophilic vitamins (A, E, D and K) and will be tested in cannulated and non-cannulated animals (sham operation) ($24 \times 2 = 48$ animals). Unexpected loss of animals can be caused by surgical trauma. 5 animals will be used in a training and a pilot study first to gain the necessary skills for personnel to avoid excessive loss of animals. After training loss of animals is estimated on 20% ($120\% \times 48 = 58$ animals (+5 for training)). This type of experiment will be done approximately 3 times a year ($58 \times 3 = 174$ animals (+5 for training)) considering repetition of the same vitamin. This leads to an estimation of $174 \times 5 = 870 + 5$ animals for training is 875 animals in total that will be needed for this type of experiment for the entire project duration of 5 years (maximum of 15 new formulations).

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.

Replacement

In vitro experiments will be done as much as possible. Unfortunately, the currently existing cell models can't give reliable data about absorption and permeation of highly fat soluble medicines or bile acids. This is because a cell model is an emasculated model for reality, missing features like a mucus layer and lymph and unable to form and secrete the vitamin K normally.

Reduction

The delivery systems will be tested *in vitro* and *ex vivo models* (organoids) first to allow a further screening and therefore to possibly use fewer animals. Also, the pilot study has been done to properly calculate an adequate sample size.

Personnel will be trained first to gain the necessary skills to avoid more loss of animals, making it possible to have smaller group sizes and still a sufficient power. This all leads to the reduction of the animals.

Refinement

The rat is chosen as the model because there is extensive knowledge and expertise in this species. There are a large number of bile duct cannulation models available for rats.

By cannulating instead of ligating the bile duct the model is more refined leading to less discomfort for the animals. Also, giving the animals a jugular vein cannula since the rats are under anesthesia anyway, refines the model. Last of all, giving the animals harmless drugs, like vitamin K, will refine the model, since there will barely be side effects. The total approach will prevent the animals from suffering from unnecessary pain or discomfort.

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.

Untill surgery rats will be housed in groups and have access to nesting material and *ad libitum* food and water.

To give the rats a jugular vein cannula reduces the pain and stress of drawing blood samples. Also by giving harmless active pharmaceutical components, like vitamin K, nor harmless excipients (semi-natural and natural compounds), rats will have no harmful effects of the ingredient. This will prevent them from a lot of unnecessary pain or discomfort.

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.

Not applicable

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.

The animals will be housed individually after surgery. However, they will be housed in the same room so they can still see, hear and smell each other.

After surgery the animals will have, amongst others, the jugular vein cannula sticking out of their neck. The cannula will be led through a tube attached to a jacket, but not every part of the cannula will be hidden, meaning rats could chew on each other's cannula. If the cannula is broken, rats will bleed to death. Thus, for their own safety, rats must be housed alone after surgery.

Also rats have the bile duct cannula sticking out of their neck. This cannula will be led out of the cage via the jacket to be able to collect the bile. However, if rats would be housed in one cage, chewing on the cannula could lead to rats licking each other's cannula, which would have a negative impact on the experiment. Therefore it is necessary to house the rats solitarily after surgery.

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.

Postoperative analgesics will be applied in consultation with a veterinarian from the laboratory animal facility.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Solitary housing is absolutely necessary due to cannulations and to prevent bile uptake. Animals will be fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage the next day.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

After surgery the animals will have, amongst others, the jugular vein cannula sticking out of their neck. The cannula will be led through a tube attached to a jacket, but not every part of the cannula will be hidden, meaning rats could chew on each other's cannula. If the cannula is broken, rats will bleed to death. Thus, for their own safety, rats must be housed alone after surgery.

Also rats have the bile duct cannula sticking out of their neck. This cannula will be led out of the cage via the jacket to be able to collect the bile. However, if rats would be housed in one cage, chewing on the cannula could lead to rats licking each other's cannula, which would have a negative impact on the experiment. Therefore it is necessary to house the rats solitarily after surgery. Since oral medicines will be tested, it will be necessary to keep the number of influences on the results to a minimum. When animals can eat, the food adds a huge variability to the experiments. Therefore, it will be needed to fasten the rats (12 hours maximum).

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

The period for fasting the rats after recovery will be kept as short as possible (maximum of 12 hours), so the discomfort of solitarily housing and fasting for the animals is as low as possible. Rats will be fasted overnight (8 hours) and are allowed to eat four hours after administration of the formulations. Four hours of fasting after administration will be enough to let the formulation be absorbed as was indicated by the pilot study.

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.

Loss of animals is expected to be 20% after training. Animals can be lost during surgery as well as after surgery. During surgery animals can be lost, for example because of too much blood loss. After surgery humane endpoints should be applied when animals have a clogged cannula (either bile or jugular vein), an infection in the wound or when an animal clearly shows unusual behaviour.

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

The estimation is that 20% of all animals will reach one of the above mentioned criteria.

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.

The cumulative discomfort classification will be set on 'matig'. The surgery requires full anaesthesia. This is moderate discomfort. When an animal drops out, this can be caused by 'severe' inconvenience. All the other things that will be done to the animals can be classified as 'light'.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

When animals have received bile duct cannulation, they won't be able to properly absorb their food after the experiment, because bile can't reach the intestines anymore.

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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Distribution study

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.

The objective of this experiment is to determine the main absorption site of the lipophilic drug and the distribution of the new delivery systems in the small intestine. This will be achieved by use of fluorescently labelled mixed micelles.

The animals will be divided into two groups: a group receiving bile duct cannulation and a group receiving a sham operation instead. Both groups will be divided into two groups again (control vs a new formulation based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants). The sham operation group will serve as the control group.

Rats are given an intragastrical administration of a fluorescently labelled new formulation based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants or a fluorescently labelled control group.

Four hours after administration the animal will be euthanized and immediately dissected to harvest the entire intestine. This will be segmented. All individual segments will be observed under the IVIS Imaging System, which shows the fluorescently labeled formulations, after which the segments will be rapidly stored at -80 °C until further quantitative analysis of lipophilic drugs extracted from above segments.

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.

Animals will start by having surgery with isoflurane anaesthesia (including adequate analgesia):

Receiving bile duct cannulation or a sham operation. The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.

The bile duct cannulation will be done by making an incision below the ribcage. The bile duct will be located, isolated and cannulated. The cannula will be tunnelled to the back of neck to allow the bile to drip out of the

animal [12]. The cannula will be sufficiently long enough to enable collecting the bile out of the cage. The residue of bile in the intestine will be absorbed sufficiently by the intestine and therefore the influence of endogenous bile on the absorption of lipophilic drugs is limited.

The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.

Animals will rest and recover for 2 days with free access to food in a normal cage with sawdust. And post-operative analgesia (pain killer) will be provided.

After recovery the animals will be brought back to the standard animal rooms and fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage. The small intestines will be emptied from food during the fastening and influence of diet will be minimised.

In order to clearly locate the position of mixed micelles in the entire intestine, rats will be euthanized 4 hours after administration of the new formulation.

Bile duct cannulation (and not ligation) is chosen since this has the least impact on the animal: if a rat will be ligated, the bile can't flow away. Because rats don't have a gallbladder, the bile will build up directly in the liver. This will make the rats uncomfortable and may possibly lead to diseases like jaundice. By putting a cannula the bile will freely drop away on the outside of the animal, leading to less discomfort for the animal. On top of this, it will also be possible to collect the bile and use this in *in vitro* experiments.

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

In this type of experiment the outcome will be the intensity of fluorescently labelled micelles in the different parts of the intestine.

The group size is calculated using Lehr's formula based on data from literature: a standardized effect of 0,05, a standard deviation of 0,0225 [11], a power of 80% and a two-sided significance level of 0,05. This leads to a group size of 6-8 animals.

B. De dieren

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

Mature rats (6-8 weeks, 250g $\pm$ 25g) bred in Europe and of commercial origin will be used. Both male and female rats can be used. Rats are selected because they are the most widely used animals in biomedical research. Second of all, rats are the smallest animals by whom it will be possible to cannulate their bile ducts. Thirdly, rats with bile duct cannulation have often been used as a model where bile doesn't reach the intestine [12].

Number of animals

Experiments will be set up in a way to compare two new formulations with a control group (a glycocholic acid/egg phospholipid based formulation that is already on the market as a control, 8x3=24 animals). Maximum of 5 new formulations based on different lipophilic vitamins (A, E, D and K) will be tested in cannulated and non-cannulated animals (sham operation) (24x2=48 animals). Unexpected loss of animals can be caused by surgical trauma. 5 animals will be used in a training first to gain the necessary skills for personnel to avoid more loss of animals. Those 5 animals are the same as discussed in attachment 1. After training loss of animals is estimated on 20% (20%x48=10 animals). This type of experiment will be done approximately 2 times a year ((48+10)x2=116 animals) considering the repetition of the same formulation. This leads to an estimation of 116x5=580 animals in total that will be needed for this type of experiment for the entire project duration of 5 years.

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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Replacement

In vitro experiments will be done as much as possible. Unfortunately, *in vitro* experiments can tell us nothing about the distribution of particles through the entire intestinal tract. *In vitro* models can tell something about parts of the intestine, but *in vitro* models do not show the entire GI-tract. For this reason, distribution studies can not be done in *in vitro* models.

Reduction

The delivery systems will be tested *in vitro* and *ex vivo models* (organoids) first to allow a further screening and therefore to possibly use fewer animals.

Personnel will be trained first to gain the necessary skills to avoid more loss of animals, making it possible to have smaller group sizes and still a sufficient power.

Lastly, in case the pharmacokinetics study of a new formulation does not demonstrate absorption, a distribution study will not be conducted. This all leads to the reduction of the animals.

Refinement

The rat is chosen as the model because there is extensive knowledge and expertise in this species. There are a large number of bile duct cannulation models available for rats.

By cannulating instead of ligating the bile duct the model is more refined leading to less discomfort for the animals. Last of all, giving the animals harmless drugs, like vitamin K, will refine the model, since there will barely be side effects. The total approach will prevent the animals from suffering from unnecessary pain or discomfort.

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.

Until surgery rats will be housed in groups and have access to nesting material and *ad libitum* food and water.

Also by giving harmless active pharmaceutical components, like vitamin K, nor harmless excipients (semi-natural and natural compounds) rats will have no harmful effects of the ingredient. This will prevent them from a lot of unnecessary pain or discomfort.

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.

Not applicable

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.

The animals will be housed individually after surgery. However, they will be housed in the same room so they can still see, hear and smell each other.

After surgery the rats will have the bile duct cannula sticking out of their neck. The cannula will be led

through a tube attached to a jacket, but not every part of the cannula will be hidden, meaning rats could chew on each other's cannula. This cannula will be led out of the cage via the jacket to be able to collect the bile. However, if rats would be housed in one cage, chewing on the cannula could lead to rats licking each

other's cannula, which would have a negative impact on the experiment. Therefore, it is necessary to house the rats solitarily after surgery.

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.

Postoperative analgesics will be applied in consultation with a veterinarian from the laboratory animal facility.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Solitary housing is absolutely necessary due to cannulations and to prevent bile uptake. Animals will be fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage the next day.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Rats have the bile duct cannula sticking out of their neck with bile being collected outside of the cage. When multiple animals are housed in 1 cage, it would be possible for the rats to chew each other's bile duct cannula and lick the bile, leading to a failed experiment. Therefore solitarily housing is absolutely necessary.

Distribution can be completely different when food or digesting food is present in the GI-tract. To be able to keep the variability low, animals need to have no food in their tracts. Therefore, it will be needed to fasten the rats.

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

The period for fasting the rats after recovery will be kept as short as possible (overnight, maximum of 12 hours), so the discomfort of solitarily housing and fasting for the animals is as low as possible.

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.
Loss of animals is expected to be 20% after training. Animals can be lost during surgery as well as after surgery. During surgery animals can be lost, for example because of too much blood loss. After surgery humane endpoints should be applied when animals have a clogged cannula (either bile or jugular vein), an infection in the wound or when an animal clearly shows unusual behaviour.
Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?
The estimation is that 20% of all animals will reach one of the above mentioned criteria.
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.
The cumulative discomfort classification will be set on 'matig'. The surgery requires full anaesthesia. This is moderate discomfort. When an animal drops out, this can be caused by 'severe' inconvenience. All the other things that will be done to the animals can be classified as 'light'.

Einde experiment

L. Wijze van doden
Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?
☐ Nee
☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.
The experiment involves dissecting the animals to be able to investigate the distribution of the particles in the intestines. Euthanizing the animals is absolutely necessary for this reason.
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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2016.I.861.012
2. Titel van het project : Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients
3. Titel van de NTS : Nieuwe medicijnen met vetoplosbare geneesmiddelen voor cholestatistische patiënten

4. Type aanvraag:

- ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
- ☐ wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht

Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247

Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ☒ ontvangen door DEC: 25-11-2016
- ☐ aanvraag compleet:
- ☒ in vergadering besproken: 07-12-2016
- ☐ anderszins behandeld:
- ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 12-12-2016/13-12-2016
- ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- ☐ aanpassing aanvraag:
- ☒ advies aan CCD: 19-01-2017

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 12-12-2016
- Datum antwoord: 13-12-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

- 3.1 Beschrijving doelstellingen: U schrijft hier: *"De doelstelling van dit project is het ontwikkelen van zulk soort nieuwe medicijnen. De doelgroep van dit project zijn cholestatische baby's. De nieuwe medicijnen zijn daarom gemakkelijk toe te dienen en bestaan vooral uit natuurlijke en semi-natuurlijke componenten, waardoor ze veilig zijn"*. Als de DEC het goed begrepen heeft zijn cholestatische baby's niet de doelgroep. Al zouden baby's wel de doelgroep zijn, dan nog is het niet zo dat de beoogde formuleringen *daarom* gemakkelijk toe te dienen zijn. Ook klopt het niet dat de medicijnen die uit natuurlijke of semi-natuurlijke componenten bestaan om die reden als veilig kunnen worden beschouwd. De logica van deze passage ontgaat de DEC dan ook volledig. De DEC raadt u aan dit beter te formuleren.

Dit stuk tekst is aangepast naar: "De doelgroep van dit project zijn cholestatische patiënten. De nieuwe medicijnen zijn bij voorkeur gemakkelijk toe te dienen (ook bij baby's) en bestaan vooral uit natuurlijke en semi-natuurlijke componenten. Met het gebruik van natuurlijke en semi-natuurlijke componenten wordt geprobeerd een zo veilig mogelijk product te maken."

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang: U schrijft hier: *"Eén daarvan zal in ieder geval een medicijn zijn met vitamine K voor baby's die geen gal kunnen produceren"*. Dit zou eigenlijk moeten zijn: ...voor baby's waarbij de gal niet in de darm terecht komt.

Dit is aangepast is aangepast in de gesuggereerde tekst.

- 3.5 Indeling dierproeven naar de verwachte ernst: Hier zegt u: *"Ongeveer 20% van de dieren zou kunnen doodgaan door ernstig ongemak"*. Door deze formulering lijkt het alsof 20% van de dieren het humaan eindpunt bereikt, terwijl dat niet bedoeld wordt. De DEC raadt u aan dit anders te formuleren.

Het is geherformuleerd in: "In het ernstigste geval zou ongeveer 20% van de dieren kunnen lijden aan ernstig ongemak."

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Het gebruik van de benaming *model voor cholestase* wekt de verkeerde indruk, omdat het hier niet gaat om een diermodel voor cholestase waarin een therapie voor cholestase getest zal worden. Daar richt dit project zich helemaal niet op. Wellicht is het beter om te spreken over een model waarbij geen gal in de darm komt.

Ik meen dat we in het projectvoorstel niet de term 'model voor cholestase' hebben gebruikt. Dit hebben we wel in andere documenten gebruikt. Daar is het dan ook aangepast. We hebben het in het stuk tekst projectvoorstel 3.1 achtergrond wel over cholestatische patiënten en cholestatische condities. Bij patiënten heb ik het laten staan, omdat het daadwerkelijk gaat over patiënten die cholestase hebben. Waar condities staat heb ik het aangepast in condities waarbij gal de darm niet bereikt. Hopelijk heb ik uw opmerking zo goed begrepen.

- 3.1 Achtergrond: De DEC vraagt zich af waarom er 15 nieuwe formuleringen getest worden. De argumentatie daarvoor dient te worden opgenomen in het projectvoorstel. Indien hier een wetenschappelijke overweging achter zit, dan deze graag vermelden.
We hebben gekozen voor 15 formuleringen op basis van een schatting. De opbouw van deze schatting is nu beschreven in het projectvoorstel.
- 3.1 Achtergrond: U schrijft in de aanvraag: *"Our group can make delivery systems based on mixed micelles that are stable for oral delivery using a new approach"*. Wat bedoeld u met *new approach*? Kunt u een tipje van de sluier oplichten? Het belang van de aanvraag hangt immers sterk af van de vraag hoe kansrijk deze nieuwe benadering is.
Er is een toelichting gegeven over welke manieren wij de 'new approach' zien. Hopelijk is deze toelichting voldoende voor u om een beoordeling te doen.
- 3.1 Achtergrond: Er wordt gerefereerd naar resultaten van pilotstudies. De DEC verzoekt u in de aanvraag duidelijk te vermelden dat dit om pilotstudies uit het verleden gaat (waarvoor u dus nu geen vergunning vraagt). De huidige formulering werkt wat verwarrend.
Ik geloof dat we in de het projectvoorstel niet verwijzen naar de pilotstudie. In de bijlage wel. Daarom is dit hier verduidelijkt.

Bijlage 1

- Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: In de aanvraag staat: *"Rats will be fastened (fasted, neemt de DEC aan?) overnight and are allowed to eat four hours after administration of the formulations"*. Waarschijnlijk bedoelt de u hier "gedurende vier uur na toediening" en niet "vier uur na toediening". Graag verhelderen.
Het gaat hier inderdaad om 'fasted'. Dit is om die reden aangepast. Het is de bedoeling dat de ratten gedurende 4 uur na toediening van het geneesmiddel nog worden gevast. Dit geeft het geneesmiddel de tijd om opgenomen te kunnen worden. Daarna mag de rat weer eten zonder dat dat invloed zal hebben op de opname van het geneesmiddel. Er wordt dus 8 uur voor het toedienen gestart met vasten.

Bijlage 2

- B. De dieren: Het is de DEC niet duidelijk waarom hier maar 1 nieuwe formulering en in vorige bijlage 2 nieuwe formuleringen worden getest. Graag verhelderen.
Dit is aangepast naar 2 formuleringen.
- H. Pijn en pijnbestrijding: U heeft hier nee aangevinkt in plaats van ja. Dit is niet correct. Graag wijzigen.
Dit is aangepast.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:

- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:
- Datum expert advies:
- Advies expert:

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang.

Steeds meer nieuwe geneesmiddelen bevatten lipofiele (vetoplosbare) componenten, welke nauwelijks oplosbaar zijn in water. Bij orale toediening beperkt dit de biologische beschikbaarheid van deze componenten, aangezien ze moeten worden opgelost in de vloeistoffen van het darmlumen. Het lichaam heeft een mechanisme ontwikkeld om de lipofiele componenten te kunnen absorberen. Dit mechanisme bestaat uit een reeks processen die uiteindelijk leiden tot het verpakken van lipofiele componenten in gemengde micellen in het lumen van de darm. Gemengde micellen bestaan uit een samenvoeging van galzuren, monoglyceriden en vetzuren. De vorming van deze gemengde micellen is dus essentieel voor de absorptie van geneesmiddelen met lipofiele componenten door het menselijk lichaam. Mensen met een cholestase produceren geen gal, waardoor geen gemengde micellen gevormd kunnen worden en de lipofiele componenten uit een medicijn niet goed kunnen worden opgenomen door het maagdarmkanaal. Ook vet oplosbare vitamines, zoals vitamine K, zijn door een gebrek aan galzuren moeilijk op te nemen door het lichaam. Tekorten aan vitamines kunnen leiden tot allerlei ziekten. Bij baby's kan een tekort aan, bijvoorbeeld, vitamine K leiden tot ernstige stollingsproblemen, wat vervolgens kan leiden tot hersenbloedingen. Met behulp van het voorliggende project wil de aanvrager daarom in ratten onderzoeken of een nieuw afgiftesysteem voor medicijnen ontwikkeld kan worden waarbij de medicijnen verpakt worden in van nature voorkomende micellen. De uitdaging daarbij is om een *formule* te vinden die ook stabiel is in de maag.

Het project is opgedeeld in een tweetal fasen, te weten een farmacokinetiekstudie (bijlage 1) en een distributiestudie (bijlage 2). In de eerste bijlage zal de farmacokinetiek van nieuwe formules bepaald worden met en zonder endogene gal in de darm. Hiervoor wordt een ratmodel gebruikt, waarbij de gal niet in de darm terecht komt. Het doel van bijlage 2 is het bepalen van de belangrijkste absorptieplaats van lipofiele geneesmiddelen en het bepalen van de verdeling van de nieuwe afgiftesystemen in de dunne darm. Daarnaast kan de distributiestudie een verklaring geven voor de verschillen die eventueel gezien zullen worden in de farmacokinetiekstudie. Informatie uit beide studies kan worden gebruikt voor de optimalisering of de verdere ontwikkeling van de formulering. De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen

is helder en vergelijkbaar met voorbeeld 4B uit de 'Handreiking Invulling Definitie Project'. Daarom meent de DEC Utrecht dat deze aanvraag een toetsbaar project is.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het ontwikkelen van een nieuw afgiftesysteem voor lipofiele geneesmiddelen, gebaseerd op de van nature voorkomende micellen, die stabiel zijn bij een lage pH-waarde in de maag. Het uiteindelijke doel van het project is om geneesmiddelen met lipofiele componenten effectief te laten zijn bij orale toediening aan cholestatische patiënten. Het betreft een fundamenteel en translationeel onderzoek. De DEC acht vertaling van de resultaten naar de mens mogelijk. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: proefdieren, cholestatische patiënten en de onderzoekers. Zoals bij C1 vermeld, is het voor mensen met cholestase niet of nauwelijks mogelijk om lipofiele componenten uit medicijnen op te nemen vanwege het ontbreken van gal. Door een afgiftesysteem te ontwikkelen, waarbij de vet oplosbare componenten worden 'verpakt' in galzouten kunnen cholestase patiënten medicijnen eenvoudiger toegediend krijgen.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en als gevolg van de experimenten zullen de dieren stress en pijn ondervinden. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het ontwikkelen van deze nieuwe techniek bijdraagt aan een goede wetenschappelijke reputatie. Wetenschappelijke status kan door de onderzoeker van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC Utrecht geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.
6. Er is geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met *in vitro* en *in vivo* onderzoek op het gebied van nanomedicijnen. De DEC is er daarom van overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel

proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.

8. Voorafgaand aan het project zullen afgiftesystemen *in vitro* onderzocht worden. Alleen wanneer de *in vitro* modellen veelbelovende resultaten opleveren, zullen nieuwe formules *in vivo* getest worden. In de eerste fase (bijlage 1) zal de farmacokinetiek van het nieuwe afgiftesysteem bepaald worden met en zonder endogene gal in de darm. Hiervoor wordt een ratmodel gebruikt, waarbij de gal niet in de darm terecht komt. De dieren zullen random verdeeld worden over twee groepen, waarbij één groep onder anesthesie een galgang canule krijgt aangebracht en de andere groep een shamoperatie ondergaat. Bij alle dieren zal een canule in de halsslagader worden aangebracht om bloed af te nemen. Nadat de dieren hersteld zijn zullen zij een nacht gevast worden, waarna de nieuwe formule middels orale gavage wordt toegediend. Het vasten is nodig om de variatie, veroorzaakt door voeding, te beperken. Vervolgens zal op diverse tijdstippen bloed worden afgenomen. Om de biologische beschikbaarheid te bepalen en om de uitkomsten te vergelijken met voorgaande distributiestudies, zullen de maximale plasmaconcentratie (Tmax) en de 'Area Under the Curve' (AUC) de primaire uitkomstparameters zijn.

Net als in bijlage 1 zal bij de dieren in bijlage 2 onder anesthesie, al dan niet, een galgangcanule worden geïmplant. Om de absorptieplaats en de verdeling van de formule in de dunne darm te bepalen, zullen de gemengde micellen gelabeld worden met een fluorescent middel. Met behulp van imaging kunnen de micellen gevolgd worden. Voordat de gelabelde micellen oraal worden toegediend, worden de dieren voor een nacht gevast. Vier uur na toediening van de formule worden de dieren gedood om de positie van de gemengde micellen in de organen exact te lokaliseren.

De DEC is van mening dat het project goed doordacht is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen, het te gebruiken diermodel goed beargumenteerd is binnen het kader van de vraagstelling en dat verwacht mag worden dat de doelstellingen van het project behaald zullen worden.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
 - ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
 - ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - ☐ Zwerfdieren (10h)
 - ☐ Hergebruik (1e lid 2)
 - ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Tijdens de chirurgische ingreep zullen de dieren een canule in de halsslagader en eventueel een galgang canule geïmplanteerd krijgen, welke beiden uit de nek van de rat zullen steken. Andere ratten kunnen daaraan gaan knagen. Wanneer de canule in de halsslagader kapot geknaagd wordt kunnen de dieren dood bloeden en wanneer de galgangcanule kapot geknaagd wordt kunnen de dieren elkaars gal binnen krijgen, wat effect kan hebben op de resultaten van de studie. Om die redenen worden ze individueel gehuisvest. De dieren zullen elkaar wel kunnen zien, horen en ruiken.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het cumulatieve ongerief is voor beide bijlagen ingeschat als matig vanwege het implanteren van de canules onder anesthesie. Het vasten, het toedienen van de formule en de euthanasie zullen licht ongerief geven.
12. De integriteit van de dieren wordt met name in gedragsmatig opzicht aangetast. Omdat deze canules niet kapot mogen gaan worden de dieren solitair gehuisvest en omdat de dunne darm vrij moet zijn van voedsel worden de dieren een nacht gevast. Door beide handelingen wordt de dieren de mogelijkheid ontnomen om bepaalde aspecten van hun natuurlijk gedrag uit te oefenen (gedragsmatige aantasting). Aan het einde van de experimenten worden de dieren gedood hetgeen als een aantasting van fysieke integriteit kan worden beschouwd.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Indien de dieren te veel bloed verliezen tijdens de operatie, de canule verstopt raakt, een wondinfectie optreedt of ongewoon/afwijkend gedrag vertonen, wordt een dier uit de proef gehaald. Verwacht wordt dat ca. 20% van de dieren het humane eindpunt bereikt.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Zoals bij C8 reeds vermeld, worden de *in vivo* experimenten voorafgegaan door *in vitro* experimenten. De *in vivo* experimenten zijn noodzakelijk omdat *in vitro* onderzoek met gekweekte darmcellen niet als volledige vervanging kunnen dienen voor het gehele maagdarmkanaal. De gekweekte darmcellen kunnen geen informatie geven over de absorptie en permeatie van de lipofiele geneesmiddelen of galzuren, omdat bepaalde functies in de darmcellen ontbreken zoals de slijmvlieslaag en de lymfe. Ook kunnen de *in vitro* darmcellen geen resultaten geven over de verdeling van de nieuwe afgiftesystemen in de dunne darm.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel t.o.v. de gekozen strategie en looptijd. Doordat alleen de afgiftesystemen geselecteerd worden die bij het *in vitro* onderzoek goede resultaten laten zien, wordt voor het *in vivo* onderzoek al een eerste shifting gemaakt. Dit heeft effect op het aantal benodigde dieren. De operaties zullen worden uitgevoerd door ervaren medewerkers waardoor de operatieve uitval beperkt wordt.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is gekozen voor het gebruik van ratten omdat er binnen de onderzoeksgroep veel kennis en expertise is het werken met ratten. Daarnaast is er veel literatuur beschikbaar over ratmodellen waarbij de galgang gecannuleerd wordt. Voor dit specifieke model is gekozen, en niet voor een model waarbij de galgang wordt afgebonden, omdat dit model tot het minste ongerief leidt. Bij de dieren zal ook een canule worden aangebracht in de halsslagader om de verschillende bloedafnames eenvoudig, zonder stress en pijnloos te laten verlopen.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Omdat de dieren een galgang canule geïmplanteerd krijgen, zullen ze niet meer in staat zijn om hun voedsel goed te absorberen omdat het gal de darmen niet meer kan bereiken. Daarnaast is het in bijlage 2 noodzakelijk om post mortem onderzoek te verrichten om de positie van de gemengde micellen in de organen exact te lokaliseren. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel ratten worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek gericht op het ontwikkelen van een nieuw afgiftesysteem voor lipofiele geneesmiddelen de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met matig ongerief. Daar staat tegenover dat er van dit onderzoek belangrijke nieuwe wetenschappelijke ontwikkelingen op het gebied van de 'verpakking' en opname van lipofiele geneesmiddelen verwacht mag worden. De DEC kent daar veel gewicht aan toe. Op korte termijn kunnen deze nieuwe ontwikkelingen van substantieel belang zijn voor mensen die weinig of geen gal aanmaken, waardoor lipofiele geneesmiddelen nauwelijks of niet kunnen worden opgenomen door het lichaam. Als gevolg hiervan kunnen bij deze patiënten ernstige tekorten en gebreken ontstaan. Tot nu toe zijn geen geschikte alternatieve toedieningsmethoden beschikbaar.

Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project bijdragen aan het ontwikkelen van een nieuwe afgiftemethode voor geneesmiddelen met lipofiele componenten, welke oraal en effectief toegediend kunnen worden aan cholestatische patiënten. Mensen die lijden aan cholestase, zijn er bij gebaat wanneer met behulp van dit nieuwe afgiftesysteem, lipofiele medicijnen oraal kunnen worden toegediend en hun werking niet verliezen omdat de lipofiele delen niet kunnen worden opgenomen in het darmlumen. Het is aannemelijk dat de translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Dat het voor de individuele onderzoeker van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC Utrecht daar weinig gewicht aan toe.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC Utrecht van oordeel dat het ontwikkelen van een nieuw afgiftesysteem voor lipofiele geneesmiddelen een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - ☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
 - ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.
 - ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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
AVD108002017846

Bijlagen

2

Datum 25 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 24 januari 2017. Het gaat om uw project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002017846. 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:

25 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017846

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
25 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017846

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 30275924
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Biofarmacie, faculteit betawetenschappen
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

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

Datum:

25 januari 2017

Aanvraagnummer:

DEC08002017846

Over uw project

Geplande startdatum:

1 april 2017

Geplande einddatum:

1 april 2022

Titel project:

Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients

Titel niet-technische samenvatting:

Nieuwe medicijnen met vetoplosbare geneesmiddelen voor cholestatische patiënten

Naam DEC:

DEC Utrecht

Postadres DEC:

Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC:

dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.187,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

☒ DEC-advies**Ondertekening**

Naam:



Functie:



Plaats:

Utrecht

Datum:

24 januari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


**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
AVD108002017846
Bijlagen
2

Datum 25 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 25 januari 2017
Vervaldatum: 24 februari 2017
Factuurnummer: 170846
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002017846	€ 1.187,00

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.

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 15 februari 2017 17:14
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: AVD108002017846:aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

Op 24 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients" met aanvraagnummer AVD105802017846.

Welke informatie nog nodig

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

De inschatting van het cumulatieve ongerief is niet geheel duidelijk. In de bijlagen dierproeven wordt aangegeven dat het cumulatief ongerief wordt ingeschat als matig. De DEC is ook van mening dat het cumulatieve ongerief matig is en dat dit realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Volgens u kunnen dieren die uitvallen echter ernstig ongerief ondergaan. Uit de beschrijving van de humane eindpunten en de NTS blijkt dat het gaat om maximaal 20% van de dieren. Hieruit kan opgemaakt worden dat maximaal 20% van de dieren ernstig ongerief zal ondergaan. U wordt verzocht aan te geven hoeveel dieren ernstig ongerief zullen ondergaan.

U geeft aan in bijlage 3.4.4.1. een aantal dieren te gebruiken voor training en een pilot studie. Uit de aanvraag blijkt echter niet welke pilot studie uitgevoerd gaat worden en welke keuzes n.a.v. de pilot studie gemaakt zullen worden. U wordt verzocht dit te verhelderen.

Opsturen informatie

De CCD zou uw aanvraag graag in de eerstkomende vergadering bespreken. Wij zouden het daarom op prijs stellen als u de aanvullende informatie uiterlijk donderdag 16 februari kunt aanleveren. Wij realiseren ons dat dit erg kort dag is. Mocht dit niet lukken, u heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie op te sturen. U kunt deze informatie onder vermelding van het aanvraagnummer (AVD108002017846) aanleveren via NetFTP of per e-mail.

Wanneer een beslissing

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 16 februari 2017 11:45
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvullende informatie AVD108002017846

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte leden van de CCD,

In uw email van 15 februari jongstleden vraagt u om extra informatie over het project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients". In deze mail geef ik u graag de gevraagde informatie.

Ernstig ongerief

Over 5 jaar zullen er maximaal 1455 ratten gebruikt worden. Twintig procent komt neer op ongeveer 291 ratten. Die zouden kunnen lijden aan ernstig ongerief. Wij verwachten door middel van training dit percentage zo laag mogelijk te houden en daarom kan deze hoeveelheid gezien worden als een maximum aantal ratten dat ernstig ongerief zal ondergaan.

Training en pilot studie

De pilot studie waarnaar wordt verwezen in de aanvraag is een studie die reeds is uitgevoerd in Melbourne, Australië (november 2015). Deze pilot studie valt daarom niet binnen het bereik van de huidige aanvraag. Echter, data van die studie zijn wel gebruikt om een degelijke groepsgrootte te berekenen.

Ik hoop u met deze email van voldoende informatie te hebben voorzien.

Hartelijke groet,

[REDACTED]



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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Pharmacokinetics study

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.

The objective of this type of experiment is to determine the pharmacokinetic profile of a new formulation under conditions with and without endogenous bile in the intestine. Therefore, animals need to be a model for patients where bile doesn't reach the intestine.

The animals will be divided randomly into two groups: a group receiving bile duct cannulation and a group receiving a sham operation instead. Both groups will be divided into three groups again (control vs two new formulations based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants). The sham operation group will serve as the control group.

The formulation will be given intragastrically to the animals and blood samples will be drawn at different time points.

Subsequently, the rats will be euthanized. Blood samples will be analysed by a previously validated method of analysis and pharmacokinetic parameters, like maximum plasma concentration (T_{max}) and area under the curve (AUC), will be calculated. Those pharmacokinetic parameters are the primary outcome parameters.

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.

Animals will start by having surgery with isoflurane anaesthesia (including adequate analgesia):

- Receiving bile duct cannulation or a sham operation as a control group. The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.
- Receiving jugular vein cannulation.

The bile duct cannulation will be done by making an incision below the ribcage. The bile duct will be located, isolated and cannulated. The cannula will be tunnelled to the back of neck to allow the bile to drip out of the animal [12]. The cannula will be sufficiently long enough to enable collecting the bile out of the cage. In the

2-day period between operation and experiment, the residue of bile in the intestine will be absorbed sufficiently by the intestine and therefore the influence of endogenous bile on the absorption of lipophilic drugs is absent.

The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.

For the jugular vein cannula an incision in the neck of the animal will be made through which the jugular vein can be located, isolated and cannulated. The cannula will be tunneled to the back of the neck. Cannulas will be filled and flushed with 10 IU/ml heparin in saline to maintain cannula patency.

Animals will rest and recover for 2 days with free access to food in a normal cage with sawdust. And post-operative analgesia (pain killer) will be provided.

After recovery the animals will be brought back to the standard animal rooms and fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage. The small intestines will be emptied from food during this period of fastening and influence of diet will thereby be minimised.

After treatment blood samples (max 8 ml / kg in total) will be drawn at different time points from the jugular vein cannula with minimal discomfort for the animal.

Bile duct cannulation (and not ligation) is chosen since this has the least impact on the animal: if a rat will be ligated, the bile can't flow away. Due to the fact that rats do not have a gallbladder, the bile will build up directly in the liver. This will make the rats uncomfortable and may possibly lead to diseases like jaundice. By putting a cannula in the bile duct the bile will freely drop away outside of the animal, leading to less discomfort for the animal. Another advantage of cannulation is that it will be possible to collect the bile and use this in *in vitro* experiments.

Since all animals need to receive surgery anyway to turn into a model where bile doesn't reach the intestine, it is decided to add a jugular vein cannula as well. This way there is no extra discomfort for the animal and frequent blood sampling will barely lead to discomfort for the animal.

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

In this type of experiment mixed micelles are tested on their absorption profile; outcome parameters are blood concentrations over time (C_{max} , area under the curve (AUC), $t_{1/2}$).

The group size is calculated using Lehr's formula based on data from pilot studies done in the past (conducted in Melbourne, Australia in November 2015, out of the reach of this project) (standardized difference of 2 and SD of 1,3975), a power of 80% and a two-sided significance level of 0,05. This leads to a group size of 6-8 animals.

B. De dieren

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

Mature rats (6-8 weeks, 250g $\pm$ 25g) bred in Europe and of commercial origin will be used. Both male and female rats can be used. Rats are selected because they are the most widely used animals in biomedical research. Second of all, rats are the smallest animals by whom it will be possible to cannulate their bile ducts. Thirdly, rats with bile duct cannulation have often been used as a model where bile doesn't reach the intestine [12].

Number of animals

Experiments will be set up in a way to compare one or multiple new formulations with a control (a glycocholic acid/egg phospholipid based formulation that is already on the market). In one experiment, on average two new formulations will be compared to a control ($3 \times 8 = 24$ animals). All new formulations based on different lipophilic vitamins (A, E, D and K) and will be tested in cannulated and non-cannulated animals (sham operation) ($24 \times 2 = 48$ animals). Unexpected loss of animals can be caused by surgical trauma. 5 animals will be used in a training and a pilot study first to gain the necessary skills for personnel to avoid excessive loss of animals. After training loss of animals is estimated on 20% ($120\% \times 48 = 58$ animals (+5 for training)). This type of experiment will be done approximately 3 times a year ($58 \times 3 = 174$ animals (+5 for training)) considering repetition of the same vitamin. This leads to an estimation of $174 \times 5 = 870 + 5$ animals for training is 875 animals in total that will be needed for this type of experiment for the entire project

duration of 5 years (maximum of 15 new formulations).

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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Replacement

In vitro experiments will be done as much as possible. Unfortunately, the currently existing cell models can't give reliable data about absorption and permeation of highly fat soluble medicines or bile acids. This is because a cell model is an emasculated model for reality, missing features like a mucus layer and lymph and unable to form and secrete the vitamin K normally.

Reduction

The delivery systems will be tested *in vitro* and *ex vivo models* (organoids) first to allow a further screening and therefore to possibly use fewer animals. Also, the pilot study has been done to properly calculate an adequate sample size.

Personnel will be trained first to gain the necessary skills to avoid more loss of animals, making it possible to have smaller group sizes and still a sufficient power. This all leads to the reduction of the animals.

Refinement

The rat is chosen as the model because there is extensive knowledge and expertise in this species. There are a large number of bile duct cannulation models available for rats.

By cannulating instead of ligating the bile duct the model is more refined leading to less discomfort for the animals. Also, giving the animals a jugular vein cannula since the rats are under anesthesia anyway, refines the model. Last of all, giving the animals harmless drugs, like vitamin K, will refine the model, since there will barely be side effects. The total approach will prevent the animals from suffering from unnecessary pain or discomfort.

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.

Untill surgery rats will be housed in groups and have access to nesting material and *ad libitum* food and water.

To give the rats a jugular vein cannula reduces the pain and stress of drawing blood samples. Also by giving harmless active pharmaceutical components, like vitamin K, nor harmless excipients (semi-natural and natural compounds), rats will have no harmful effects of the ingredient. This will prevent them from a lot of unnecessary pain or discomfort.

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.

Not applicable

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.

The animals will be housed individually after surgery. However, they will be housed in the same room so they can still see, hear and smell each other.

After surgery the animals will have, amongst others, the jugular vein cannula sticking out of their neck. The cannula will be led through a tube attached to a jacket, but not every part of the cannula will be hidden, meaning rats could chew on each other's cannula. If the cannula is broken, rats will bleed to death. Thus, for their own safety, rats must be housed alone after surgery.

Also rats have the bile duct cannula sticking out of their neck. This cannula will be led out of the cage via the jacket to be able to collect the bile. However, if rats would be housed in one cage, chewing on the cannula could lead to rats licking each other's cannula, which would have a negative impact on the experiment. Therefore it is necessary to house the rats solitarily after surgery.

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.

Postoperative analgesics will be applied in consultation with a veterinarian from the laboratory animal facility.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Solitary housing is absolutely necessary due to cannulations and to prevent bile uptake. Animals will be fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage the next day.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

After surgery the animals will have, amongst others, the jugular vein cannula sticking out of their neck. The cannula will be led through a tube attached to a jacket, but not every part of the cannula will be hidden, meaning rats could chew on each other's cannula. If the cannula is broken, rats will bleed to death. Thus, for their own safety, rats must be housed alone after surgery.

Also rats have the bile duct cannula sticking out of their neck. This cannula will be led out of the cage via the jacket to be able to collect the bile. However, if rats would be housed in one cage, chewing on the cannula could lead to rats licking each other's cannula, which would have a negative impact on the experiment. Therefore it is necessary to house the rats solitarily after surgery. Since oral medicines will be tested, it will be necessary to keep the number of influences on the results to a minimum. When animals can eat, the food adds a huge variability to the experiments. Therefore, it will be needed to fasten the rats (12 hours maximum).

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

The period for fasting the rats after recovery will be kept as short as possible (maximum of 12 hours), so the discomfort of solitarily housing and fasting for the animals is as low as possible. Rats will be fasted overnight (8 hours) and are allowed to eat four hours after administration of the formulations. Four hours of fasting after administration will be enough to let the formulation be absorbed as was indicated by the pilot study.

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.

Loss of animals is expected to be 20% after training. For this type of experiment this will concern 175 rats. Those animals can be lost during surgery as well as after surgery. During surgery animals can be lost, for example because of too much blood loss. After surgery humane endpoints should be applied when animals have a clogged cannula (either bile or jugular vein), an infection in the wound or when an animal clearly shows unusual behaviour.

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

The estimation is that 20% of all animals will reach one of the above mentioned criteria.

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.

The cumulative discomfort classification will be set on 'matig'. The surgery requires full anaesthesia. This is moderate discomfort. When an animal drops out, this can be caused by 'severe' inconvenience. All the other things that will be done to the animals can be classified as 'light'.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

When animals have received bile duct cannulation, they won't be able to properly absorb their food after the experiment, because bile can't reach the intestines anymore.

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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Distribution study

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.

The objective of this experiment is to determine the main absorption site of the lipophilic drug and the distribution of the new delivery systems in the small intestine. This will be achieved by use of fluorescently labelled mixed micelles.

The animals will be divided into two groups: a group receiving bile duct cannulation and a group receiving a sham operation instead. Both groups will be divided into two groups again (control vs a new formulation based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants). The sham operation group will serve as the control group.

Rats are given an intragastrical administration of a fluorescently labelled new formulation based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants or a fluorescently labelled control group.

Four hours after administration the animal will be euthanized and immediately dissected to harvest the entire intestine. This will be segmented. All individual segments will be observed under the IVIS Imaging System, which shows the fluorescently labeled formulations, after which the segments will be rapidly stored at -80 °C until further quantitative analysis of lipophilic drugs extracted from above segments.

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.

Animals will start by having surgery with isoflurane anaesthesia (including adequate analgesia):

Receiving bile duct cannulation or a sham operation. The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.

The bile duct cannulation will be done by making an incision below the ribcage. The bile duct will be located, isolated and cannulated. The cannula will be tunnelled to the back of neck to allow the bile to drip out of the

animal [12]. The cannula will be sufficiently long enough to enable collecting the bile out of the cage. The residue of bile in the intestine will be absorbed sufficiently by the intestine and therefore the influence of endogenous bile on the absorption of lipophilic drugs is limited.

The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.

Animals will rest and recover for 2 days with free access to food in a normal cage with sawdust. And post-operative analgesia (pain killer) will be provided.

After recovery the animals will be brought back to the standard animal rooms and fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage. The small intestines will be emptied from food during the fastening and influence of diet will be minimised.

In order to clearly locate the position of mixed micelles in the entire intestine, rats will be euthanized 4 hours after administration of the new formulation.

Bile duct cannulation (and not ligation) is chosen since this has the least impact on the animal: if a rat will be ligated, the bile can't flow away. Because rats don't have a gallbladder, the bile will build up directly in the liver. This will make the rats uncomfortable and may possibly lead to diseases like jaundice. By putting a cannula the bile will freely drop away on the outside of the animal, leading to less discomfort for the animal. On top of this, it will also be possible to collect the bile and use this in *in vitro* experiments.

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

In this type of experiment the outcome will be the intensity of fluorescently labelled micelles in the different parts of the intestine.

The group size is calculated using Lehr's formula based on data from literature: a standardized effect of 0,05, a standard deviation of 0,0225 [11], a power of 80% and a two-sided significance level of 0,05. This leads to a group size of 6-8 animals.

B. De dieren

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

Mature rats (6-8 weeks, 250g $\pm$ 25g) bred in Europe and of commercial origin will be used. Both male and female rats can be used. Rats are selected because they are the most widely used animals in biomedical research. Second of all, rats are the smallest animals by whom it will be possible to cannulate their bile ducts. Thirdly, rats with bile duct cannulation have often been used as a model where bile doesn't reach the intestine [12].

Number of animals

Experiments will be set up in a way to compare two new formulations with a control group (a glycocholic acid/egg phospholipid based formulation that is already on the market as a control, 8x3=24 animals). Maximum of 5 new formulations based on different lipophilic vitamins (A, E, D and K) will be tested in cannulated and non-cannulated animals (sham operation) (24x2=48 animals). Unexpected loss of animals can be caused by surgical trauma. 5 animals will be used in a training first to gain the necessary skills for personnel to avoid more loss of animals. Those 5 animals are the same as discussed in attachment 1. After training loss of animals is estimated on 20% (20%x48=10 animals). This type of experiment will be done approximately 2 times a year ((48+10)x2=116 animals) considering the repetition of the same formulation. This leads to an estimation of 116x5=580 animals in total that will be needed for this type of experiment for the entire project duration of 5 years.

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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Replacement

In vitro experiments will be done as much as possible. Unfortunately, *in vitro* experiments can tell us nothing about the distribution of particles through the entire intestinal tract. *In vitro* models can tell something about parts of the intestine, but *in vitro* models do not show the entire GI-tract. For this reason, distribution studies can not be done in *in vitro* models.

Reduction

The delivery systems will be tested *in vitro* and *ex vivo models* (organoids) first to allow a further screening and therefore to possibly use fewer animals.

Personnel will be trained first to gain the necessary skills to avoid more loss of animals, making it possible to have smaller group sizes and still a sufficient power.

Lastly, in case the pharmacokinetics study of a new formulation does not demonstrate absorption, a distribution study will not be conducted. This all leads to the reduction of the animals.

Refinement

The rat is chosen as the model because there is extensive knowledge and expertise in this species. There are a large number of bile duct cannulation models available for rats.

By cannulating instead of ligating the bile duct the model is more refined leading to less discomfort for the animals. Last of all, giving the animals harmless drugs, like vitamin K, will refine the model, since there will barely be side effects. The total approach will prevent the animals from suffering from unnecessary pain or discomfort.

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.

Until surgery rats will be housed in groups and have access to nesting material and *ad libitum* food and water.

Also by giving harmless active pharmaceutical components, like vitamin K, nor harmless excipients (semi-natural and natural compounds) rats will have no harmful effects of the ingredient. This will prevent them from a lot of unnecessary pain or discomfort.

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.

Not applicable

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.

The animals will be housed individually after surgery. However, they will be housed in the same room so they can still see, hear and smell each other.

After surgery the rats will have the bile duct cannula sticking out of their neck. The cannula will be led

through a tube attached to a jacket, but not every part of the cannula will be hidden, meaning rats could chew on each other's cannula. This cannula will be led out of the cage via the jacket to be able to collect the bile. However, if rats would be housed in one cage, chewing on the cannula could lead to rats licking each

other's cannula, which would have a negative impact on the experiment. Therefore, it is necessary to house the rats solitarily after surgery.

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.

Postoperative analgesics will be applied in consultation with a veterinarian from the laboratory animal facility.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Solitary housing is absolutely necessary due to cannulations and to prevent bile uptake. Animals will be fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage the next day.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Rats have the bile duct cannula sticking out of their neck with bile being collected outside of the cage. When multiple animals are housed in 1 cage, it would be possible for the rats to chew each other's bile duct cannula and lick the bile, leading to a failed experiment. Therefore solitarily housing is absolutely necessary.

Distribution can be completely different when food or digesting food is present in the GI-tract. To be able to keep the variability low, animals need to have no food in their tracts. Therefore, it will be needed to fasten the rats.

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

The period for fasting the rats after recovery will be kept as short as possible (overnight, maximum of 12 hours), so the discomfort of solitarily housing and fasting for the animals is as low as possible.

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.

Loss of animals is expected to be 20% after training. Animals can be lost during surgery as well as after surgery. During surgery animals can be lost, for example because of too much blood loss. After surgery humane endpoints should be applied when animals have a clogged cannula (either bile or jugular vein), an infection in the wound or when an animal clearly shows unusual behaviour.

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

The estimation is that 20% of all animals will reach one of the above mentioned criteria. For this type of experiment this will concern 116 rats maximally.

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.

The cumulative discomfort classification will be set on 'matig'. The surgery requires full anaesthesia. This is moderate discomfort. When an animal drops out, this can be caused by 'severe' inconvenience. All the other things that will be done to the animals can be classified as 'light'.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

The experiment involves dissecting the animals to be able to investigate the distribution of the particles in the intestines. Euthanizing the animals is absolutely necessary for this reason.

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

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 1 maart 2017 9:56
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: FW: AVD108002017846:aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

Op 24 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients" met aanvraagnummer AVD105802017846.

De CCD heeft uw aanvraag besproken en heeft nog een aanvullende vraag over uw project.

-Heeft u 'physiologically based pharmacokinetic modelling' overwogen? Kunt u aangeven waarom dit wel/niet toepasbaar is voor dit project?

Opsturen informatie

U heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie op te sturen. U kunt deze informatie onder vermelding van het aanvraagnummer (AVD108002017846) aanleveren via NetFTP of per e-mail.

Wanneer een beslissing

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Deelnamenummer NVWA 10800, Utrecht University

03-03-2017

Remark 1. What *in vitro* experiments are used to evaluate the criteria before *in vivo* studies?

Before the *in vivo* study, the following *in vitro* experiments are used to evaluate the criteria for different formulations (vitamin K loaded micelles):

a) Stability at gastric pH

Orally administered Konakion[®] MM (a commercial formulation of vitamin K) fails to prevent Vitamin K deficiency bleeding in cholestatic infants due to impaired intestinal absorption of vitamin K due to the pathophysiological conditions in the upper gastrointestinal tract of those infants. Konakion[®] MM is unstable and forms large aggregates at low pH of the stomach because of the protonation of the carboxylate group of glycocholic acid (one of the components of Konakion[®] MM), eventually causing coalescence of the formulation. To study the stability of various vitamin K loaded micelles, size changes were measured by DLS (Dynamic Light Scattering). Only vitamin K loaded micelles which are stable (size remain the same) without coalescence will be further studied.

b) Stability and diffusion in mucus

We applied FRET (Förster resonance energy transfer) to investigate the stability of vitamin K loaded micelles (fluorescently labeled micelles) in mucus. Furtherly, diffusion of fluorescently labeled vitamin K loaded micelles are studied by fluorescently recovery after photo-bleaching technique. Only stable and permeable vitamin K loaded micelles in mucus will be further studies for *in vivo* studies.

c) Uptake and transport study using Caco-2 cell monolayers

Different vitamin K loaded micelles are exposed to fasted state simulated gastric or intestinal fluids (FaSSGF and FaSSIF) to mimic the condition of G-I tract. Subsequently, uptake or transport of vitamin K by differentiated Caco-2 cells are investigated. In this way, vitamin K loaded micelles which have higher uptake efficacy than commercial Konakion[®] MM will be further studied using organoids from Ileum.

d) Uptake and transport study using organoids from Ileum

One drawback of Caco-2 cells is that they don't create mucus. So promising vitamin K loaded micelles from section c) will be further evaluated using organoids from Ileum which can create mucus and are more physiologically relevant to G-I tract than Caco-2 cells.

Vitamin K loaded micelles which have higher uptake or transport efficacy than commercial Konakion[®] MM will be finally studied for in vivo study.

Remark 2. Why we don't use physiologically based pharmacokinetic modelling in our project before the in vivo study?

Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models can help reduce animal use by allowing an extrapolation to other dosing regimens within a species, and thus help the design of future studies. However, this type of model does not eliminate the need for *in vivo* experiments and there is a lack of accuracy in describing the disposition and elimination processes making oral predictions less reliable. The oral absorption process is complex and in many cases has been shown to be species-specific [1, 2]. Based on previous literature, predictions of oral C_{max} , AUC and T_{max} based on in silico PBPK model is more successful for Biopharmaceutical Classification System (BCS) class 1 compounds (when the absorption mechanism is based on passive permeability and lipophilicity of a drug can be predicted by logP value) compared to BCS class 2, 3 and 4 drugs [3]. In our case, the compound (vitamin K) we are investigating belongs to BCS class 2 (absorption mechanism is not only based on passive permeability but also receptors like scavenger receptor B1, CD-36, NPC1L1 mediated). And the mechanism is even more complex because vitamin K will be packed into chylomicrons inside the cells and will be translocated into the blood circulation via lymph duct from the small intestine. Above factors make it more difficult to build a PBPK model to predict the oral bioavailability of our vitamin K loaded micelles. However, it will be nice to find collaborations with groups who have available commercial software like Gastro plus and are experts in this field (to evaluate the predictions, normally hundreds of model compounds need to be applied to ensure a reliable calculation). We will consider about that and thank you for such valuable suggestions.

[1] L. Di, B. Feng, T.C. Goosen, Y. Lai, S.J. Steyn, M.V. Varma, R.S. Obach, A perspective on the prediction of drug pharmacokinetics and disposition in drug research and development, *Drug Metabolism and Disposition*, 41 (2013) 1975-1993.

[2] H. Musther, A. Olivares-Morales, O.J. Hatley, B. Liu, A.R. Hodgegan, Animal versus human oral drug bioavailability: Do they correlate?, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57 (2014) 280-291.

[3] N. Gobeau, R. Stringer, S. De Buck, T. Tuntland, B. Faller, Evaluation of the GastroPlus[™] Advanced Compartmental and Transit (ACAT) Model in Early Discovery, *Pharmaceutical research*, 33 (2016) 2126-2139.

Disciplinegroep Biofarmacie en Farmaceutische Technologie
| Departement Farmaceutische Wetenschappen | Faculteit Betawetenschappen | Universiteit Utrecht | David de
Wied gebouw | Universiteitsweg 99 | Postbus 80082 - 3508 TB Utrecht | T: | F: | E:



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[REDACTED]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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

AVD108002017846

Bijlagen

1

Datum 6 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 24 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients" met aanvraagnummer AVD108002017846. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Wij hebben u om nadere informatie gevraagd over de in bijlage 3.4.4.1 beschreven pilot en het ongerief dat de dieren zullen ondergaan. Wij kunnen ons vinden in de nadere verduidelijking van uw aanvraag. Wij hebben u nadien gevraagd toe te lichten welk type in vitro experimenten voorafgaand aan de in vivo proeven worden uitgevoerd en te onderbouwen waarom fysiologisch gebaseerde farmacokinetische modellen niet worden toegepast. Wij kunnen ons niet volledig vinden in uw antwoord op de tweede vraag. Zie 'Beslissing' voor meer informatie. U heeft, naar aanleiding van onze vragen, uw aanvraag gewijzigd op 16 februari 2017, 28 februari 2017 en 3 maart 2017.

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.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

De aanvraag is gericht op het ontwikkelen van een nieuw afgiftesysteem voor medicijnen. Het project is opgedeeld in een tweetal fasen, te weten een farmacokinetiekstudie (bijlage 3.4.4.1) en een distributiestudie (bijlage 3.4.4.2). Wij hebben u in het kader van vermindering gevraagd welk type in vitro experimenten voorafgaand aan de in vivo proeven worden uitgevoerd. Daarnaast hebben we u ook gevraagd te onderbouwen waarom fysiologisch

gebaseerde farmacokinetische modellen niet kunnen worden toegepast. Hoewel wij ons kunnen vinden in uw toelichting over de uit te voeren in vitro experimenten, zijn wij er niet van overtuigd dat het niet mogelijk is fysiologisch gebaseerde farmacokinetische modellen te gebruiken voor dit project. U geeft zelf ook aan dat het met de juiste software en in samenwerking met experts wellicht wel mogelijk is een dergelijk model te ontwikkelen en toe te passen.

In artikel 10 lid 1 sub a van de wet staat 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. Aangezien het uitvoeren van fysiologisch gebaseerde farmacokinetische modellen kan leiden tot een significante reductie in het benodigd aantal dieren, hebben wij een voorwaarde aan de vergunning toegevoegd. U dient voorafgaand aan de studie in samenwerking met experts na te gaan of het mogelijk is fysiologisch gebaseerde farmacokinetische modellen te ontwikkelen en gebruiken voor uw project. De resultaten van dit onderzoek dient u ter goedkeuring aan de CCD voor te leggen.

U kunt met uw project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients" starten. De vergunning wordt afgegeven van 6 april 2017 tot en met 1 april 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 19 januari 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:
6 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017846

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.

Datum:

6 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017846

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:

**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: Universiteit Utrecht

Adres: Postbus 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 6 april 2017 tot en met 1 april 2022, voor het project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients" met aanvraagnummer AVD108002017846, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair hoofddocent.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 24 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 3 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 3 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 19 januari 2017, ontvangen op 24 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 16 februari 2017, 28 februari 2017 en 3 maart 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Pharmacokinetics study				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	875	20% Ernstig 80% Matig	
3.4.4.2. Distribution study				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	580	20% Ernstig 80% Matig	

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2023

Aanvraagnummer:

AVD108002017846

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

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

U dient in het kader van vermindering voorafgaand aan de uitvoering van het project, in samenwerking met experts op het gebied van fysiologisch gebaseerde farmacokinetische modellen, te onderzoeken of dergelijke modellen gebruikt kunnen worden voor dit project. De resultaten van dit onderzoek dient middels een wijzigingsaanvraag ter goedkeuring aan de CCD te worden voorgelegd. De CCD zal op basis van deze aanvullende informatie beoordelen of de farmacokinetiekstudie al dan niet uitgevoerd mag worden. Het betreft hier een opschortende voorwaarde. U mag pas met de farmacokinetiekstudie starten zodra u van de CCD goedkeuring heeft gekregen.



Aanvraagnummer:

AVD108002017846

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:

AVD108002017846

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

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b 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.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.