

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

Dit formulier dient uiterlijk **7 werkdagen** voor de DEC vergadering (zie TNO Bulletin Dierproeven en Alternatieven of Intranet) volledig ingevuld in het bezit te zijn van:

Secretariaat DEC

[Redacted]

[Redacted]

E-mail: [Redacted]

telefoon: [Redacted] / fax: [Redacted]

Instituut: TNO [Redacted]

ALGEMEEN

1. Titel van het onderzoeksplan:

The effect of gene-silencing via siRNA on Collagen-Induced Arthritis (CIA) in the rat

Titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):

Matrix Revolutions: siRNA/gene transfer platform

2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD):

E-mail adres onderzoeker:

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder nr:

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD):

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

Externe samenwerking (indien van toepassing):

2. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan:

april 2005

(Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v. DEC nr., via e-mail: [Redacted])

Geplande duur van de onderzoeksplan:

9 maanden

Locatie waar dieren worden gehouden:

TNO [Redacted]

4. Codenummers volgens KvW-registratie m.i.v. 1998:

groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1, 4 en 5	1	02	1	48	03	1	1	01	12	4	2	4	1
2, 3 en 6	1	02	1	48	03	1	1	01	12	4	2	3	1

RELEVANTIE

5. Welke concrete vraag/vragen wilt u met deze dierproef beantwoorden:

Vraagstelling:

Met het huidige experiment zal verder onderzocht worden of m.b.v. de siRNA technologie de klinische verschijnselen in het collageen-geïnduceerde artritis model onderdrukt kunnen worden, waarbij TNF α gekozen wordt als target.

Toelichting:

De ontwikkeling op het gebied van de genomics (de zogenaamde DNA of RNA chips of arrays) heeft honderden, zo niet duizenden genen aan het licht gebracht die geassocieerd zijn met een ziekte. Echter deze associatie is geen bewijs dat het gen ook oorzakelijk betrokken is bij de aandoening. Daarom zijn zogenaamde target validatie technologieën essentieel om een gen causaal te verbinden met een ziekte. De cruciale eindstap is de *in vivo* validatie: in een levend organisme laten zien dat een gen causaal bij de ziekte betrokken is. Een nieuwe en snel opkomende technologie voor *in vitro* en *in vivo* validatie is het gebruik van siRNA (small interfering RNA) om het gen van interesse tijdelijk uit te schakelen.

In een vorige studie (DEC aanvraag 1548) is een start gemaakt met het *in vivo* valideren van deze technologie. Gekozen is voor een geaccepteerd ziektemodel voor reuma: collageen-geïnduceerde artritis in de rat met bekende ziekte targets: TNF α en MAPK p38. Expressie van siRNA moleculen gericht tegen deze targets werd bewerkstelligd door toediening van adenovirussen (Ad-siRNA-TNF α en Ad-siRNA-p38) middels 2 intra-artculaire injecties op dag 11 en 16 na inductie van de artritis. Positieve controles waren Remicade (TNF α antilichaam) en SB203508 (MAPK p38 remmer).

Resultaten:

- toediening van controle adenovirussen resulteerde in verergering van de artritis. Dit was onverwacht, aangezien in gezonde dieren het injecteren van controle virussen geen effect had.
- toediening van Ad-siRNA-TNF α resulteerde in een onderdrukking van de klinische score van 22% t.o.v. dieren die het controle virus hadden gekregen (niet significant)
- toediening van Remicade gaf een onderdrukking van de klinische score van 31% t.o.v. onbehandelde dieren (niet significant)
- toediening van Ad-siRNA-p38 resulteerde in een onderdrukking van de klinische score van 11% t.o.v. dieren die het controle virus hadden gekregen (niet significant)
- toediening van SB203508 gaf een onderdrukking van de klinische score van 39% t.o.v. onbehandelde dieren (niet significant)

Doel:

Met name de resultaten met Ad-siRNA-TNF α zijn veelbelovend en we willen met de huidige studie verkennen of we door verdere optimalisatie van de studie-opzet het onderdrukkende effect van Ad-siRNA-TNF op de klinische verschijnselen in het collageen-geïnduceerde artritis model statistisch significant aan kunnen tonen. Aangezien reuma een multifactoriële ziekte is, wordt 20-30% onderdrukking van de klinische verschijnselen, wanneer slechts één target wordt aangepakt, als zeer relevant beschouwd. Een combinatie therapie van Remicade met methotrexate wordt bijvoorbeeld vaak in de patient gebruikt.

Veranderingen t.o.v. het vorige experiment:

- slechts een éénmalige intra-artculaire toediening van de adenovirussen (i.p.v. 2 i.a. injecties) om bijwerkingen door virus "booster" te verminderen.
- toediening op dag 9 (i.p.v. dag 11) om de effecten van het virus op de progressie van de ziekte te reduceren
- twee doseringen van de virussen:
 - zelfde dosering als in de vorige studie (maar dan slechts 1x toegediend)
 - 10x lagere dosis om de ontstekingsreactie door toediening van de virussen te verminderenDit naar aanleiding van het onverwachte additionele effect van toediening van controle virus op de klinische verschijnselen in het CIA model.
We gaan ervan uit dat verlaging van de dosis niet direct een verlaging van effectiviteit in onderdrukking van de target geeft, maar wel de potentie om de ongewenste bijwerking op de klinische verschijnselen te onderdrukken. Het is daarom van belang dat beide doseringen tegelijkertijd getest worden, zodat effectiviteit maar ook de bijwerkingen van deze doseringen goed vergeleken kunnen worden.
- toediening van 8 mg/kg Remicade (i.p.v. 4 mg/kg)
- 16 dieren per groep (i.p.v. 10) om de power te vergroten (zie ook paragraaf 11)

6. Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan:

6.a Maatschappelijk belang (meer dan één onderdeel kan van toepassing zijn):

6.a.1 Gezondheid mens/dier

Collageen-geïnduceerde artritis (CIA) in ratten is een betrouwbaar en internationaal geaccepteerd model voor reumatoïde artritis (reuma, RA). RA is een systemische auto-immuunziekte waarvan het ontstaan grotendeels onbekend is en die voorkomt bij 1-2% van de volwassen bevolking, merendeels vrouwen. De ziekte wordt gekenmerkt door chronische gewrichtsontstekingen, waarbij rustigere periodes worden afgewisseld met ernstige, actieve ziekte. De progressieve destructie van gewrichtsweefsels (bijv. kraakbeen en bot) als gevolg van de chronische ontsteking, leidt tot gewrichtsdeformaties, bewegingsbeperking, ernstige pijn en in een gevorderd stadium van de ziekte soms zelfs invaliditeit. De ziekte wordt gekenmerkt door een afweerreactie tegen lichaamseigen stoffen (autoantigenen). De oorzaak van deze auto-immuunreactie en de rol van autoantigenen hierin is nog steeds merendeels niet bekend. Aangezien ook goede therapie voor RA (die gewrichtsdestructie tegengaat of afremt) nog niet voorhanden is, blijft onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen en de toepassing daarvan noodzakelijk.

6.a.2 Economisch belang

Het chronische karakter van de ziekte en de toenemende mate van invaliditeit maakt RA een ziekte die relatief hoge kosten met zich meebrengt, die uiteenvallen in de directe medische kosten en daarnaast de indirecte kosten als gevolg van (gedeeltelijke) arbeidsongeschiktheid.

Daarnaast worden enorme kosten gemaakt in de ontwikkeling van geneesmiddelen, die terugverdiend moeten worden uit de prijs van de geneesmiddelen. Het huidige projectvoorstel is erop gericht een techniek te valideren die het mogelijk moet maken in een veel vroeger stadium van geneesmiddelontwikkeling te selecteren op de meest veelbelovende targets en daarmee de ontwikkelkosten drastisch te reduceren.

6.a.3 Milieu belang

6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3

Het chronische progressieve karakter van de ziekte is in toenemende mate belastend (zowel fysiek als psychisch) voor zowel patiënt als directe omgeving (familie/verzorgers).

6.b Wetenschappelijk belang:

In de laatste tien jaar heeft TNO Kwaliteit van Leven grote expertise opgebouwd op een aantal ziektegebieden, waaronder gewrichtsaandoeningen (artrose en reuma), fibrose, hart- en vaatziekten, en neurologische aandoeningen. Deze kennis is mede gestoeld op een groot aantal *in vitro* en *in vivo* ziektemodellen, die momenteel worden toegepast om ziektemechanismen op te helderen (o.a. binnen het Nieuwe Initiatief Systems Biology & Center for Medical Systems Biology), om geneesmiddelen te testen in samenwerking met farmaceutische en biotechnologie bedrijven, en om onze eigen ziekte targets te ontwikkelen en patenteren. Het ontwikkelen van de voorgestelde *in vivo* target validatie technologie zal dit ziekte-kennisplatform een enorme meerwaarde geven en een belangrijke hiaat in de kennis opvullen.

7. Is of wordt de wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan of het totale onderzoeksproject beoordeeld?

Zo ja, door welk daartoe aangewezen college, in welke context en met welk resultaat?

Het voorstel is getoetst op wetenschappelijke kwaliteit tijdens projectleiders overleg binnen de divisie. Verder maakt de studie deel uit van het siRNA/gene transfer platform binnen het Matrix Revolutions project dat ondersteund wordt door de Raad van Bestuur. Tevens wordt dit project ondersteund door [REDACTED], die een belangrijke bijdrage levert in de vorm van virussen. Het voorstel beoogt het valideren van de aanpak om middels siRNA nieuwe targets te kunnen valideren in relevante ziektemodellen.

Zo nee, waarom niet?

PROEFOPZET

8. Wat is de aard van deze dierproef (meer dan 1 rondje kan van toepassing zijn):

- ☐ nieuw nog niet eerder uitgevoerd onderzoeksplan
- ☒ herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan, DEC-advies nr.: 1548 Experiment wordt herhaald met aanpassingen in de groepsgrootte en de doseringen van de adenovirussen en Remicade.
- ☐ proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:
 - wettelijke eis:
 - testrichtlijn:
- ☐ proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- ☐ anders, n.l.:

9. Aan welke behandelingen worden de dieren onderworpen?

Omschrijf zodanig dat dit op het niveau van het individuele dier duidelijk wordt, met inbegrip van het tijdschema en de frequentie waarmee behandelingen worden uitgevoerd. Beschrijf daarbij alle experimentele technieken waaraan de dieren worden onderworpen, met inbegrip van ingrepen, doseringstechnieken, euthanasietechnieken, enz. Verwijs, voorzover van toepassing, naar standaardprotocol voor de nadere uitwerking.

Collageen-geïnduceerde arthritis wordt opgewekt in 96 vrouwelijke Lewis ratten (8-12 weken oud, RT-1¹) volgens een standaard protocol (zoals beschreven in DEC aanvraag 1218). In het kort: De ratten worden geïmmuniseerd met 2 mg/kg rundercollageen (type II) in incompleet Freund's adjuvant (IFA) verspreid in 4 subcutane injecties op de rug. Na zeven dagen volgt een booster met 100 µg collageen in IFA in de staart basis. 4 tot 8 dagen na de booster zal de ziekte zich ontwikkelen in ongeveer 80% van de dieren en worden de zieke dieren gerandomiseerd over de volgende behandelgroepen van dus elk 16 ratten:

- [1] Onbehandeld (controle dat artritis zich goed ontwikkelt)
- [2] Ad-siRNA-TNF α dosis 1: 2x10⁹ VP* (gelijk aan dosis in vorige studie)
- [3] Ad-siRNA-TNF α dosis 2: 2x10⁸ VP (10x lagere dosis dan in vorige studie)
- [4] Ad-siRNA-scrambled dosis 1: 2x10⁹ VP (negatieve controle, dat het virus zelf de ziekte niet beïnvloedt)
- [5] Ad-siRNA-scrambled dosis 2: 2x10⁸ VP (negatieve controle, dat het virus zelf de ziekte niet beïnvloedt)
- [6] Remicade dosis: 8 mg/kg (positieve controle voor TNF α virus; 2x hogere dosis dan in vorige studie)

* VP= virus partikel

10. Beschrijf de proefopzet en geef het proefschema bij voorkeur volgens onderstaand voorbeeld:

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
Groep 1	Dag 0: immunisatie Dag 7: booster Dag ~26: opofferen	anesthesie s.c. immunisatie en booster scoring & wegen (dagelijks)	16	V
Groep 2	Dag 0: immunisatie Dag 7: booster Dag 9: i.a. injectie Dag ~26: opofferen Behandeling = Ad-siRNA-TNF α dosis 1	anesthesie s.c. immunisatie en booster i.a. injectie (1x) scoring & wegen (dagelijks)	16	V
Groep 3	Als groep 2, Behandeling = Ad-siRNA-TNF α dosis 2	Als groep 2	16	V
Groep 4	Als groep 2, Behandeling = Ad-siRNA-scrambled dosis 1	Als groep 2	16	V
Groep 5	Als groep 2, Behandeling = Ad-siRNA-scrambled dosis 2	Als groep 2	16	V
Groep 6	Als groep 2, Behandeling = Remicade, echter toediening middels i.v. injecties (2x, dag 9 en 14)	Als groep 2 i.v. injecties (i.p.v. i.a.)	16	V

11. Hoeveel dieren zullen in totaal worden gebruikt? Onderbouw dit aantal op basis van statistische parameters, literatuurgegevens of verwijs, indien van toepassing, naar proefopzet/standaard protocol:

Indien reservedieren voor het onderzoeksplan worden bestemd, dient dit nader te worden gespecificeerd. Motiveer de noodzaak voor reservedieren en het aantal, en geef aan welke behandelinge deze dieren eventueel ondergaan.

Totaal 96 ratten

96 ratten (6 experimentele groepen van elk 16 ratten). De incidentie van de artritis is met deze stam en genotype (RT-1¹), en immunisatie methode (collageen) ~80%. In het vorige experiment is een behandelingseffect van 22% met Ad-siRNA-TNF α geconstateerd ten opzichte van het controle virus (Ad-siRNA-scrambled), echter door de groepsgrootte van 10 in die studie was dit verschil niet significant. Daarom hebben we nu voor een groepsgrootte van 16 dieren gekozen om ook behandelingseffecten van minimaal 22% statistisch significant aan te kunnen tonen. Dit is gebaseerd op de verwachte spreiding in de uitkomst parameters (~20% CV) en het feit dat 20% van de dieren uiteindelijk niet ziek worden ($n = 2 \times (1,96 + 0,84)^2 \times (20/22)^2 = 13$ dieren + 3 (20%) dieren die niet ziek worden = 16 dieren per groep in totaal).

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, en welke ras/stam wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

Welke sexe wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

N.B. indien sprake is van een transgene lijn, in Nederland gemaakt na 1 april 1997, dient hiervoor een vergunning door de Minister van LNV te zijn verleend. Specificeer bij vraag 8.

Lewis RT-1¹ ratten - deze stam is gevoelig voor het ontwikkelen van collageen geïnduceerde arthritis. Met name vrouwelijke ratten van deze stam zijn gevoelig voor CIA. Het rundercollageen dat gebruikt zal worden (Arthrogen[®] bovine type II collagen; Chondrex, Inc.) is ook met name geschikt voor deze stam.

13. Wat is de herkomst van de dieren:

aangekocht van proefdierfokker

☐ aangekocht elders, n.l.:

☐ overcomplete dieren

☐ eigen fok

☐ reeds eerder gebruikte proefdieren (geef aan in welk soort dierproef)

☐ anders, n.l.:

14. Wat is het eindpunt van de dierproef:

euthanasie

☐ gebruik voor een volgende proef

☐ andere vergunninghouder

☐ anders, n.l.:

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?

Vermeld groepssamenstelling, kooitype, voedselsysteem en andere zaken die relevant zijn voor het welzijn van de dieren.

Type 2 bak met 2 ratten per bak

Voedsel ad libitum (Sniff; Bio-Services)

Water ad libitum (pH 2.8)

ONGERIEF

16. Beschrijf de aard van het ongerief:

Geef hierbij, gespecificeerd per handeling of mogelijk gevolg van doseringen, het ongerief dat de dieren waarschijnlijk ondergaan.

- Ongerief door de immunisatie met collageen en booster in Incompleet Freund's Adjuvant is gekwalificeerd als **matig**.
- Ongerief door het i.a. of i.v. doseren (onder anesthesie) is gekwalificeerd als **matig**.
- Ongerief van het scoren is gekwalificeerd als **gering/matig**.
- Het ontstaan van ziekte leidt tot **matig/ernstig** ongerief als gevolg van de ontstekingsreactie in 80% van de dieren; de overige 20% van de ratten ontwikkelen geen ziekte (ongerief blijft **matig**)
 - ✓ In de onbehandelde groep (1) en in de controle groepen (4 en 5) blijft dit **matig/ernstig** agv de artritis.
 - ✓ In de behandelde groepen (2, 3 en 6) zal de behandeling leiden tot onderdrukking van de artritis en zal **matig** worden.

17. Kwalificeer vervolgens de kans op ongerief (mate van ongerief en de duur of de mate van herhaling):

Tabel: mate en duur van het van het maximaal te verwachten ongerief		Duur van het ongerief			
		< 1 dag	1-7 dagen	7-30 dagen	> 30 dagen
Mate van ongerief	A: gering				
	B: gering/matig				
	C: matig			58	
	D: matig/ernstig			38	
	E: ernstig				
	F: zeer ernstig				

Splits eventueel uit naar groepen of aantallen, indien relevant (dit kan door de betreffende aantallen dieren in de betreffende cel van de tabel weer te geven). Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar zijn indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.

18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen?

Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.

Pijnbestrijding is strijdig met het experiment: de pijnstilling kan interfereren met de behandeling en ziekteontwikkeling. In een vorige rat CIA studie (DEC 1218) is in een dier buprenorphine pijnstilling toegepast. Agv deze pijnstilling werd door de rat het gewricht veel meer belast, met als gevolg een ernstiger artritis.

Zieke dieren zullen voedsel/water in de bak krijgen wanneer eten uit de ruif agv de ziekte moeilijker wordt

19. Op welke indicatie (criteria!) worden dieren uit de proef genomen, danwel voortijdig gedood?

Dieren worden continue beoordeeld op ziekte-ontwikkeling en effect van medicatie. Ziekte wordt uitgedrukt in lichaamsgewicht t.o.v. ontstaan ziekte (dag 12-14) en tevens zwelling en roodheid van de gewrichten. Dieren worden uit de proef genomen wanneer [1] de controle dieren ernstig ziek zijn en het effect van behandeling duidelijk is; of [2] bij meer dan 20% verlies aan lichaamsgewicht agv de ziekte (t.o.v. gewicht aan begin van de ziekte); of [3] wanneer agv de ziekte huidbeschadigingen aan de pootjes ontstaan

20. Zijn er bijkomende risico's te voorzien, en wat is de kans hierop?

Specificeer hier het risico op en de aard van mogelijke complicaties, in aanvulling op het antwoord op vraag 16 en in samenhang met de beantwoording van vraag 19.

Onwaarschijnlijk. Het model is goed beschreven en complicaties op grond van de ziekte zijn niet te verwachten. De medicatie wordt lokaal (i.a.) of systemisch (i.v.) toegediend en complicaties zijn niet te verwachten.

ALTERNATIEVEN

21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning), zowel *in vivo* als *in vitro*, bestaan voor deze dierproef?

Geef aan, in relatie tot het antwoord op vraag 5, waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:

Er zijn geen geschikte alternatieven voor het diermodel voorhanden

Geef ook aan in welke zin eventueel gebruik wordt gemaakt van alternatieve methoden:

22. Is info of advies gevraagd over alternatieve methoden aan:

O TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. ()

O Art. 14 functionaris (), tel ()

O Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)

O elders, n.l.:

zo nee; waarom niet: De Matrix biologie groep heeft een jarenlange expertise op gebied van artritis onderzoek en de daarbij gebruikte diermodellen. Ook worden *in vitro* modellen gebruikt om aspecten van de ziekte te bestuderen. De bedoeling van het huidige experiment is om ziekte targets die *in vitro* zijn geïdentificeerd en gevalideerd, in een *in vivo* model te testen. Daarom is een alternatief voor het huidige doel/model beschikbaar.

ANDERE ASPEKTEN

23. Welke andere dan de hiervoor vermelde aspecten zijn naar uw mening voor de toetsing van deze dierproef door de DEC van belang?

Hier kan alle informatie aan de orde gesteld worden die u verder nog onder de aandacht van de Commissie wenst te brengen.

Het valideren van de siRNA target validatie methode in het ratten CIA model maakt het mogelijk dat TNO een unieke positie ontwikkelt om nieuwe ziekte targets te valideren. Het doel hiervan is dat de grote hoeveelheid nieuwe ziekte targets die in genomics/proteomics/metabolomics studies worden geïdentificeerd, eerst *in vitro* worden teruggebracht tot een kleiner aantal die vervolgens *in vivo* kunnen worden gevalideerd, voordat er nieuwe medicijnen ontwikkeld worden tegen targets die dan later niet relevant blijken te zijn. Dit voorkomt dat vele nieuwe geneesmiddelen in proefdierstudies getest moeten worden en zorgt ervoor dat compoundontwikkeling efficiënter gaat.

24. Geef hieronder, indien van toepassing, toelichting op de door u in dit aanmeldformulier gebruikte afkortingen:

RA = reumatoid arthritis = reuma

CIA = collageen-geïnduceerde arthritis

IFA = Incompleet Freund's adjuvant

onderzoeker

hoofd divisie

datum:

datum:

Na behandeling:

secretaris DEC