

Datum ontvangst DEC: 04-12-2006

DEC nr: 2251

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

voepel aanworp

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

E-mail: [redacted] / telefoon: [redacted] fax: [redacted]

Instituut: [redacted]

ALGEMEEN

1. **Titel van het onderzoeksplan:** *The humanized psoriasis mouse model*. Humane psoriasis huid getransplanteerd op immunodeficiënte (BNX) muizen; een *in vivo* model voor psoriasis (**overkoepelende aanvraag**)

2. **Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD):** [redacted]
E-mail adres onderzoeker: [redacted]
Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder nr: [redacted]

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

[redacted]

Externe samenwerking (indien van toepassing):

[redacted]

Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan:

zie verkorte aanvragen

Geplande duur van de onderzoeksplan:

Variërend van 5 tot 6 maanden

Locatie waar dieren worden gehouden:

[redacted]

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

zie verkorte aanvraag

groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
x	1	01	1	9 per groep	03	1	1	01	12	4	1	3	1

RELEVANTIE

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

In patiënten met Psoriasis is het proces van huidvernieuwing verstoord ten gevolge waarvan de huid gaat schilferen, irriteren en ontsteken. Dit komt in belangrijke mate door een verhoogde proliferatie en differentiatie van keratinocyten. De oorzaak van deze overmatige proliferatie is onbekend. Tevens is er sprake van een overmatige ontstekingsreactie die gemedieerd wordt door Th1 cellen. Dit wordt mede geïllustreerd door het feit dat onderdrukking van de immuunrespons met corticosteroiden (b.v. cortison of betamethason) een gunstig effect heeft op het verloop van psoriasis.

Concrete vragen die met deze dierproeven beantwoord kunnen worden:

- Identificatie van stoffen/verbindingen met remmende (anti-inflammatoire) werking in psoriasis
- Vaststellen effectieve dosis
- Vaststellen effectiviteit toedieningsroute
- Inzicht in werkingsmechanismen

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

Psoriasis is een chronische huidziekte waarvan het ontstaan grotendeels onbekend is en die voorkomt bij ongeveer 2-3% van de volwassen bevolking. De prevalentie van psoriasis in Japan is zelfs rond de 5%. De ziekte wordt gekenmerkt door vershilfering van de huid en chronische ontstekingen. Door de abnormaal versnelde groei van huidcellen raakt de huid geïrriteerd en ontstaan er lokaal ontstekingen. De huid wordt rood en dik. De laesies bij psoriasis kunnen pijnlijk zijn en vaak is er sprake van (ondraaglijke) jeuk. De oorzaak van deze chronische huidziekte en de rol van het immuunsysteem hierin, in het bijzonder T-cellen, is nog steeds grotendeels onbekend. Aangezien goede therapie voor Psoriasis (die abnormale celdeling, schilfering van de huid en jeuk 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 incidentie maakt psoriasis 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.

6.a.3 Milieu belang N.v.t.

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:

Studies zijn, afhankelijk van de aard van de te testen verbinding, in potentie gericht op het bestuderen van de effectiviteit van een nieuwe, anti-proliferatieve, anti-inflammatoire en preventieve therapie voor patiënten met Psoriasis. Uit eerder onderzoek met gebruik van humane psoriasis huid getransplanteerd op immunodeficiënte muizen is gebleken dat deze huid haar specifieke, abnormale kenmerken behoudt waardoor dit model uitermate geschikt is voor onderzoek naar therapieën voor deze ziekte. Tot dusver is dit muismodel het enige beschikbare en tevens gevalideerde model voor psoriasis. Een alternatief voor het huidige model is niet beschikbaar (zie: 22).

De meeste behandelingen van psoriasis zijn gericht op het onderdrukken van de symptomen van psoriasis. Meest bekend is de behandeling met corticosteroiden; echter, er bestaat een trend dat de psoriasis patiënten resistent worden en dat van therapie veranderd moet worden (trial-and-error benadering). De behandelingen onderdrukken vaak de symptomen, maar genezen niet. Nieuwe,

geneesmiddelen die wel een oplossing bieden voor genezing zullen een enorme vooruitgang in de therapie voor psoriasis betekenen.

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 door verschillende projectleiders binnen de divisie. Inmiddels is al enige jaren kennis op het gebied van huidziekten opgebouwd en op het psoriasismodel in het bijzonder.

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.:
- ☐ 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.: Overkoepelende aanvraag (verlenging/heraanvraag van reeds eerder goedgekeurd overkoepelende aanvraag onder DEC nr. 1794)

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.

Huidtransplantatie:

Voordat een aanvang wordt gemaakt met de handelingen worden huidbiopten en bloed afgenomen van psoriasis patiënten. Hiervoor is een aanvraag voor toestemming ingediend bij de Commissie Medische Ethiek van het [REDACTED]. De huidbiopten (doorsnede 5mm) worden getransplanteerd op immunodeficiënte BNX / SCID muizen met een leeftijd van 8-10 weken. De huid op het rug-nek gedeelte van de muizen wordt gedeeltelijk verwijderd tot op het niveau van de panniculus carnosus, waarna het huidbiopt geplaatst wordt in de geprepareerde huid van de muis. Het huidtransplantaat wordt bedekt met Op-Site® en op z'n plaats gehouden middels een gaasje en chirurgische tape. De tape wordt na 2 tot 3 weken verwijderd. De huidtransplantatie wordt steriel uitgevoerd onder inhalatie anesthesie middels 2% isofluraan. De duur van de ingreep bedraagt ongeveer 2 minuten per dier. Tijdens de transplantatie worden dieren op een warmtemat gehouden. Na de operatie worden dieren op een stukje papier gelegd (op het beddingmateriaal voor een vrije ademhaling) en continu gecontroleerd bij het wakker worden.

Ziekte-inductie transplantaat

Nadat het transplantaat is geaccepteerd (+/- 3 weken na transplantatie) worden de perifere mononucleaire bloedcellen van de donor van het huidtransplantaat geïnjecteerd (intra-dermaal) in het huidtransplantaat; dit veroorzaakt/induceert psoriasis in het transplantaat. (Er wordt geïnjecteerd met T-cellen van dezelfde donor als van het huidtransplantaat).

De getransplanteerde muizen worden na beoordelen van de huidbiopten gerandomiseerd over de behandelgroepen

Vanaf de start van de studie (na transplantatie en direct na injectie van bloedcellen donoren) zullen de muizen een keer per week worden gewogen.

Behandeling met experimentele verbindingen of referentie-verbindingen.

Toedieningsroutes: intraperitoneaal, topicaal, subcutaan, oraal, intraveneus, intramusculair (afhankelijk van de aard van de experimentele verbinding en zijn target)

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

Specifiek: zie verkorte DEC aanvragen.

Algemeen:

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
x	dag -21: transplantatie van huidbiopten patiënten 5mm (diameter) per biopt op BNX muizen dag -21 tot -3 verbandcontrole dag -3 afnemen verband; acclimatiseren biopten dag 0: injecteren van perifere bloedcellen van huiddonoren start behandeling; zie verkort protocol	Anesthesie; transplantatie huidbiopten verbandcontrole afnemen verband intradermale injectie in biopt. Onbehandeld/behandeld	9	M/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 behandelingen deze dieren eventueel ondergaan.

De incidentie van de psoriasis na transplantatie en injecteren van donor bloedcellen is normaal gesproken 100%. Gebaseerd op transplantatieresultaten uit eerdere experimenten verwachten we dat 15 - 30% van de muizen per groep niet bruikbaar zijn voor behandeling als gevolg van krimpen van het transplantaat of verlies of beschadiging van het transplantaat door loskomen van verband en/of afkrabben. Ook donor variatie (bv. door non-responders) leid tot uitvallen van datapunten. De wens bestaat om minimaal een experimenteel behandel-effect van 30-40% statistisch significant aan te tonen. Met deze gegevens en historische gegevens wordt d.m.v. Poweranalyse (van Zutphen, Bauwman en Beynen. Proefdieren en dierproeven, 2^e druk. Blz. 202-207) het aantal benodigde dieren geschat op n=9 per groep (zie ook bijgevoegde samenvatting van recente studiegegevens ter onderbouwing).

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.

Mannelijke of vrouwelijke BNX muizen - deze stam is immunodeficiënt, noodzakelijk voor acceptatie van de humane huidbiopten. Er worden in studies, i.v.m. beschikbaarheid bij de proefdierleverancier, meestal vrouwelijke dieren gebruikt

13. Wat is de herkomst van de dieren:

aangekocht van proefdierfokker

O 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 (CO₂)
- ☐ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, n.l.:

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?

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

Voor transplantatie: type 2 bak, geplaatst in een IVC (Indiv. ventilated cage) rek met 3 muizen per bak

Na transplantatie: type 2 bak, geplaatst in een IVC rek met 1 muis per bak (ter voorkoming beschadiging transplantaat door afkrabben en likken en ter voorkoming van het aan elkaar in- en vasthaken)

Zowel voor als na transplantatie worden bakken voorzien van bedding (grof), kooiverrijking en eventueel nestmateriaal (bestraald).

Voedsel ad libitum, Sniff

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 transplantatie, dat uitgevoerd wordt onder anesthesie, is gekwalificeerd als matig.

Het ongerief dat de dieren ondervinden van het dragen van tape om het transplantaat te beschermen, is gekwalificeerd als matig.

Injectie van perifere mononucleaire bloedcellen van de donor, is gekwalificeerd als matig. Wanneer de cellen zijn geïnjecteerd vindt er een specifieke, immuun gerelateerde ontstekingsreactie plaats in de getransplanteerde huid, echter niet in de huid van de muis (de muis zelf ontwikkelt geen psoriasis). Deze reactie kan wel enige irritatie bij de muis veroorzaken die hooguit 1 week duurt. Er vindt geen aanhechting van zenuwweefsel plaats tussen het transplantaat en de huid van de muis, waardoor de muis geen directe pijn van het inspuiten in de dermis van het transplantaat ondervindt.

Het ongerief dat de dieren ondervinden door dagelijkse behandeling van de muizen: zie verkorte aanvraag

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				X
	D: matig/ernstig				
	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.

Anesthesie: De transplantatie van huidbiopsen wordt uitgevoerd onder inhalatie anesthesie middels 2% Isofluraan.

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

Dieren worden continu beoordeeld op ziekteontwikkeling en effect van medicatie. Ziekte wordt uitgedrukt in lichaamsgewicht. Dieren worden uit de proef genomen wanneer [1] de (controle) dieren ernstig ziek zijn (d.w.z. daling lichaamsgewicht >20%, komt echter zelden of nooit voor); of [2] wanneer acceptatie van het transplantaat niet is geslaagd.

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

Specificeer hier het risico 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 (Wrone-Smith et al. 1996) en complicaties op grond van de ziekte zijn niet te verwachten. De mogelijke gevolgen van de toe te passen medicatie, mede op grond van toxiciteitsgegevens zullen in een verkorte aanvraag worden beschreven.

Afgelopen jaren zijn binnen onze proefdierfaciliteit en mede ten behoeve voor deze studies de studie omstandigheden (sluis naar werkruimte, schone laminair flow kast, aangesloten anesthesie apparatuur, IVC rekken voor de muizen etc.) geoptimaliseerd, waardoor garantie op zorgvuldig, steriel en met succes werken enorm toegenomen is.

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. Psoriasis is een complexe ziekte waarbij interacties tussen huid van de patiënt en het immuunsysteem een belangrijke rol spelen. Deze interacties kunnen op dit moment *in vitro* niet nagebootst worden.

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. [REDACTED]

O Art. 14 functionaris ([REDACTED] tel. [REDACTED])

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

O elders, n.l.:

zo nee; waarom niet: TNO [REDACTED] heeft een jarenlange expertise op gebied van psoriasis onderzoek en van het transplanteren van humane huid op immunodeficiente muizen in het kader van psoriasis onderzoek. Ook is een alternatief *in vivo* model gevalideerd (DECnr. 1305) om andere aspecten van de ziekte te bestuderen (oa. het aspect jeuk dat bij psoriasis patiënten een belangrijke parameter is; het mechanisme is echter wezenlijk verschillend). Echter, een alternatief voor het huidige model en in het bijzonder ter beantwoording van deze vraagstelling is niet beschikbaar. (zie 6).

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.
nvt

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

nvt

Onderzoeker

datum:

29-11-2006

Na behandeling:
secretaris DEC

Divisiehoofd

datum:

29-11-06

Bijlage overkoepelende DEC aanvraag Psoriasis

Recente studiegegevens ter onderbouwing DEC aanvragen.

Uitgevoerde studies eind 2005 t/m 2006:

1. Pierre Fabre (11 aug 2005)
2. Carna Bioscience (19 okt 2005)
3. Arakis (24 nov 2005)
4. Daiichi Asubio Pharma III (23 mrt 2006)
5. Centocor US (27 april 2006)
6. Schering Plough (gaande)
7. Wolff Arzneimittel (gaande)

Feiten:

	<u>Pierre Fabre</u>	<u>Carna</u>	<u>Arakis</u>	<u>Daiichi</u>	<u>Centocor</u>
Aantal groepen:	7	5	7	9	8
Aantal getransplanteerde dieren per groep:	11	8	8	8	8
Aantal geëvalueerde dieren per groep:	8 a 9	6	5 a 6	6	7
Referentie compound:	Betamethason	Betame- thason	CsA	CsA	CsA
ANOVA:	p=0.001	p=0.047	p=0.038	p=0.048	p=0.001
Post hoc test vs vehicle:	p=0.001 vs vehicle	p=0.048	p=0.017	p=0.041	p=0.002

Bovenstaande tabel laat zien dat we op dit moment 6 dieren per groep kunnen evalueren per studie. Hiervoor transplanteren we 8 dieren per groep (Muv Pierre Fabre studie). Indien we dit aantal naar 9 brengen mogen we verwachten n=7 per groep te kunnen evalueren en daarmee het risico van niet significante data kunnen verminderen. Hanteren we kleine groepen (transplanteren van 8 muizen) dan is het risico op niet significante data uitermate groot.

Daarnaast is bij het huidige transplantatie aantal van n=8 het behandelingseffect van geneesmiddelen die minder generiek zijn dan Betamethason (50-60% remming) of cyclosporine (30-50%) moeilijker aan te tonen. In het geval van de Pierre Fabre studie was dit bekend en is mede om deze reden gekozen tot een hogere groepsgrootte. Studies als Carna, Arakis en Daiichi zijn voorbeelden van studies die aangeven dat het moeizaam is een behandelingseffect aan te tonen met 6 of soms 5 dieren per groep. Dit is al het geval voor de generieke referentie verbindingen, laat staan de te evalueren compounds die over het algemeen een behandelingseffect hebben van 10-40%. Het is vanzelfsprekend dat het kunnen aantonen van een kleiner behandelings-effect uitermate belangrijk is voor de ontwikkeling van geneesmiddelen.