

Datum ontvangst DEC:

DEC nr:

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO**AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN**

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

Secretaresse DEC en proefdierdeskundige

[Redacted]

E-mail: [Redacted] telefoon: [Redacted] / [Redacted]

Ter vervanging van DEC2518

Kerngebied en locatie: [Redacted]

ALGEMEEN**1. Onderzoeksplan****1.1. titel:**

De bestrijding van een *Y. pestis* infectie *in vivo* met nieuwe antimicrobiële- en immunomodulerende verbindingen (peptiden)

1.2. studienummer:

032.12905/01.01

1.3. titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):

V502 7.4: Antimicrobiële peptiden

2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD): Dr Floris Bikker

E-mail adres onderzoeker:

[Redacted]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr:

[Redacted] ([Redacted])

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

[Redacted] (Art.12)

[Redacted] (Art.12)

Externe samenwerking (indien van toepassing):

N.v.t.

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan:

Z.s.m. na goedkeuring DEC-aanvraag

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

[Redacted]

Geplande duur van de onderzoeksplan:

1 jaar

Locatie waar dieren worden gehouden:

[Redacted]

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1, 2F, 3F,	01	01	01	17 (+5, +5)	03	01	01	01	12	04	01	04	01
2A t/m 2E 3A t/m 3E	01	01	01	60	03	01	01	01	12	04	01	03	01

RELEVANTIE

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

- *In vitro* zijn een aantal nieuwe antimicrobiële- en immunomodulerende verbindingen gevonden. Zijn deze verbindingen staat om de bacteriële lading na infectie te verminderen *in vivo* en dus de kans op overleving na infectie te vergroten?

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

Gedurende militaire operaties in het veld behoort toediening van therapie op basis van gestelde diagnose niet altijd tot de mogelijkheden. Dit geldt zeker in het geval van een mogelijke besmetting met een biologisch strijdmiddel. Bij de bestrijding van een onbekende besmetting of infectie kan de inzet van antimicrobiële- en immunomodulerende verbindingen met een breed werkingsspectrum daarom uitkomst bieden.

Bacteriële infecties worden bestreden met antibiotica. Echter, door onjuist of onnodig gebruik van antibiotica vormt resistentie tegen antibiotica in toenemende mate een probleem; infecties kunnen niet meer met de huidige antibiotica worden bestreden. Zodoende is ook de dreiging van het gebruik van (resistente) bacteriën bij biologische oorlogsvoering of terroristische aanslagen toegenomen.

In het licht van het bovenstaande wordt in het onderhavige werk de mogelijkheid onderzocht om bacteriële infecties te bestrijden m.b.v. een relatief nieuwe klasse van antimicrobiële en immunomodulerende verbindingen *i.e.* antimicrobiële peptiden (AMPs).

De verbindingen die in deze studie zullen worden gebruikt zijn alle AMPs. Enerzijds zijn deze AMPs gebaseerd op- en afgeleid van- de i) zgn. cathelicidine familie der AMP's. Cathelicidines komen in natuurlijke vorm voor in bijvoorbeeld mens of dier, en spelen daarbij een rol in de aangeboren afweer via van twee mechanismen: a) het af doden van een breed spectrum aan bacteriën *v.i.z.* pathogenen en b) het moduleren van het immuunsysteem door bijvoorbeeld de productie van pro-inflammatoire cytokines te remmen en zodoende een door bacteriën geïnduceerde sepsis te remmen. De duale activiteit van deze verbindingen maken deze AMP's tot een nieuwe klasse van therapeutica tegen bacteriële infecties. ii) Anderzijds zijn verbindingen afgeleid van niet natuurlijk voorkomende peptiden die d.m.v. de phage display techniek (Bikker 2007) zijn geselecteerd op binding aan bacteriën. Deze peptiden zijn door zgn. selectieronden specifiek geselecteerd voor affiniteit aan bacteriën, waaronder *Y. pestis*. Door het binden aan bacteriën en voorkomen van kolonisatie en vormen deze AMP's middels 'guided evolution' kandidaat-AMPs voor therapie. iii) Nieuwe pentapeptiden (AMPs bestaande uit slechts 5 aminozuren). Deze pentapeptiden vinden hun oorsprong in een 'kamikaze systeem' gelegen op het *mazEF* operon (Kolodkin-Gal *et al*, 2007). Deze beschreven en afgeleide peptapeptiden worden door de bacterie zelf aangemaakt tijdens stresssituaties en blijken in onze eigen handen *in vitro* een zeer hoog therapeutische gehalte te hebben. De peptides die *in vivo* getest zullen worden, zijn *in vitro* reeds getest, of worden in de nabije toekomst *in vitro* getest, op activiteit tegen een verscheidenheid aan bacteriën. Hierdoor zouden deze peptiden *in vivo* bescherming kunnen bieden tegen infecties veroorzaakt door een breed scala aan bacteriën. In dit onderzoeksproject zal vooral gekeken worden naar de bescherming tegen bacteriën die een dreiging vormen in verband met biologische oorlogsvoering. Het therapeutische effect van de verbindingen zal in eerste instantie in kaart worden gebracht in een infectiemodel voor *Yersinia pestis*, de veroorzaker van de pest. Er is voor dit pathogeen gekozen omdat voor deze bacterie de pathogeniciteit in de wetenschappelijke literatuur uitvoerig beschreven is.

6.a.2 Economisch belang

6.a.3 Milieu belang

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

6.b Wetenschappelijk belang:

De beschermende werking van AMP's tegen bacteriële infecties is reeds bewezen (Bowdish et al, J. Leuk. Biol. (2005);, Cirioni et al, Antim. Agents Chemoth. (2006)). Een aantal AMPs worden zelfs reeds gebruikt als antimicrobieel middel en zijn op voorschrift te verkrijgen bij de apotheek. Voorbeelden hiervan zijn Polymyxine B en Daptomycine. In een recent onderzoek door TNO [redacted] is de antimicrobiële werking van AMP's tegen biologische strijdmiddelen, waaronder *Y. pestis*, aangetoond *in vitro* [redacted]. Ook is bekend dat AMP's een immuunmodulerende werking hebben *in vitro* (o.a. review [redacted] et al, submitted for publication). Echter, over het beschermende effect van deze AMPs tegen biologische strijdmiddelen *in vivo* is nog niets bekend.

De experimenten uitgevoerd in DEC2518 Exp 2 wezen uit dat LL-37 een zeer toxisch effect heeft op de gevoelige longcellen. Uiteindelijk bleek dat de groep van Dr [redacted] ook dit toxische effect had waargenomen na i.n toediening van LL-37. Om dit op te lossen zijn zij overgestapt naar een ander minder toxisch AMP. Om verder meer informatie te krijgen over het testen van AMPs *in vivo* hebben we contact opgenomen met Prof Dr [redacted] en Dr. [redacted], experts op het gebied van *in vivo* therapeutica studies. Zij raadden ons aan de AMPs eerst te testen in een *in vivo* screeningmodel die de *in vitro* situatie zo goed mogelijk benadert. In dit '*ex vitro*' screeningsmodel is in feite nog geen sprake van infectie: dieren worden besmet met een bacterie, waarna direct de therapeutica (AMPs) zullen worden toegediend. De AMPs die, volgens dit model, een therapeutisch effect blijken te hebben zullen in een andere DEC verder getest worden in een echt infectiemodel.

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?

Zo nee, waarom niet?

Ja, door specialisten in Medisch Biologische aangelegenheden van [redacted]

PROEFOPZET

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

- X nieuw onderzoeksplan (ook bij gebruik van bestaande modellen met nieuwe behandeling/ teststof)
- X herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan, DECnr.: 2518
- O proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:
 - wettelijke eis:
 - testrichtlijn:
- O proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- O 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, voor zover van toepassing, naar standaardstudieplan voor de nadere uitwerking.

Opzetten screeningsmodel *Y. pestis*:

Als eerste zal er een screeningsmodel voor *Y. pestis* worden opgezet in vijf BALB/c muizen. Voor de i.v. toediening worden de dieren gefixeerd in een restrainer. Dit brengt matig ongerief met zich mee. De hoeveelheid bacteriën waarmee gestart zal gaan worden is 1000 CFU *Y. pestis* per muis in een totaal volume van 100 µL. Dit is de hoeveelheid die Ivanov en medewerkers (2008) gebruikten in hun onderzoek naar therapie tegen *Y. pestis*. Naar verwachting zal bij deze dosis op dag 2-3 de vacht van de dieren open gaan staan en er respiratoire distress optreden. Op dag 4 worden de dieren zeer lusteloos en zijn bovenstaande symptomen toegenomen tot matig/ ernstig. Indien zich deze symptomen voordoen zullen de dieren uit proef worden genomen. Treden deze symptomen niet op rond dag 4 na blootstelling is de dosis te laag geweest en moet een hogere dosis worden toegediend. In dat geval zal een nieuwe groep dieren aan een 10 maal hogere dosis worden blootgesteld. Er is gekozen voor een 10 maal verhoging

omdat ervaring leert dat kleinere stappen weinig effect hebben op de bacteriële lading (Dr. [REDACTED])

Het meten van de therapeutische effecten van nieuwe AMP's:

Na het opzetten van het screeningsmodel zal het therapeutische effect van verschillende AMP's in kaart worden gebracht. Direct na de i.v. toediening van *Y. pestis* worden de dieren i.v. behandeld met de geselecteerde AMP's. De AMP's zullen in 50 µL worden opgenomen in concentraties die zijn gebaseerd op de *in vivo* resultaten van [REDACTED] met de geselecteerde AMP's in een MSSA screeningsmodel (Dr. [REDACTED]). De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden (gewichtsafname, afwijkend gedrag, respiratoire distress, roughness van de vacht, dehydratie) om de ontwikkeling van een eventuele infectie in de verschillende groepen met elkaar te vergelijken.

Op dag 4 na toediening van *Y. pestis* worden de dieren geanesthetiseerd met Nembutal en zal d.m.v. hartpunctie bloed afgenomen worden om de hoeveelheid cytokinen in het serum te bepalen. D.m.v. cervicale dislocatie worden de dieren geëuthanaseerd en vervolgens worden de milt, longen en lever geïsoleerd om de bacteriële lading in deze organen te bepalen. De bacteriële lading van de organen en de cytokinen concentratie in het bloed van de behandelde groep zal vergeleken worden met die van de controle groep (PBS) en met de uitleesparameters van het infectiemodel.

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1	Opzetten screeningsmodel <i>Y. pestis</i> : Bepalen hoeveelheid bacterien	I.v. toediening <i>Y. pestis</i> Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal) Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	5 (+5, +5)	M
2A	Testen therapeutisch effect AMP-001 (X ug/ml)	I.v. toediening <i>Y. pestis</i> I.v. toediening AMP-001 (X ug/ml) Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal) Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	6	M
2B	Testen therapeutisch effect AMP-002 (X ug/ml)	I.v. toediening <i>Y. pestis</i> I.v. toediening AMP-002 (X ug/ml) Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal) Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	6	M
2C	Testen therapeutisch effect AMP-003 (X ug/ml)	I.v. toediening <i>Y. pestis</i> I.v. toediening AMP-003 (X ug/ml) Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal) Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	6	M
2D	Testen therapeutisch effect AMP-004 (X ug/ml)	I.v. toediening <i>Y. pestis</i> I.v. toediening AMP-004 (X ug/ml) Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal) Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	6	M
2E	Testen therapeutisch effect AMP-005 (X ug/ml)	I.v. toediening <i>Y. pestis</i> I.v. toediening AMP-005 (X ug/ml) Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal) Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	6	M
2F	Negatieve controle PBS	I.v. toediening <i>Y. pestis</i> I.v. toediening PBS Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal) Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	6	M
3A	Testen therapeutisch effect AMP-001 (Y ug/ml)	I.v. toediening <i>Y. pestis</i> I.v. toediening AMP-001 (Y ug/ml) Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal) Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	6	M
3B	Testen therapeutisch effect AMP-002 (Y ug/ml)	I.v. toediening <i>Y. pestis</i> I.v. toediening AMP-002 (Y ug/ml)	6	M

		Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal) Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie		
3C	Testen therapeutisch effect AMP-003 (Y ug/ml)	I.v. toediening <i>Y. pestis</i> I.v. toediening AMP-003 (Y ug/ml) Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal) Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	6	M
3D	Testen therapeutisch effect AMP-004 (Y ug/ml)	I.v. toediening <i>Y. pestis</i> I.v. toediening AMP-004 (Y ug/ml) Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal) Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	6	M
3E	Testen therapeutisch effect AMP-005 (Y ug/ml)	I.v. toediening <i>Y. pestis</i> I.v. toediening AMP-005 (Y ug/ml) Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal) Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	6	M
3F	Negatieve controle PBS	I.v. toediening <i>Y. pestis</i> I.v. toediening PBS Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal) Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	6	M

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 studieplan:

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.

Voor het opzetten van het screeningsmodel wordt gestart met vijf dieren die 1000 CFU bacteriën *i.v.* toegediend krijgen. In de groep zijn nog tien extra dieren opgegeven zodat, indien 1000 CFU niet het gewenste resultaat geeft, er mits noodzakelijk, nog twee andere concentraties bacteriën getest kunnen worden.

De *in vitro* geselecteerde AMP's zullen in het screeningsmodel getest worden. Dit zijn peptiden waarvan bekend is dat ze een hoog therapeutisch potentieel hebben: De peptiden zijn bij lage concentraties actief tegen *Y. pestis* en bij relatief hoge concentraties onschadelijk voor bloedcellen *in vitro* [redacted] *et al*, submitted for publication). Tevens wordt er in elk experiment een negatieve controle (PBS) meegenomen. Op dag 4 wordt het bloed en de organen geïsoleerd waarna de cytokine concentratie en bacteriële lading zal worden bepaald. Na overleg met het Erasmus MC is besloten om 6 dieren per groep te gebruiken. In het pulmonaire infectiemodel beschreven in DEC2518 werden 9 dieren per groep gebruikt, maar omdat de bacteriën en de AMPs *i.v.* worden toegediend is er minder spreiding te verwachten en volstaat 6 dieren per groep. Alle vijf de AMP's zullen tegelijk getest worden, hierdoor is er per concentratie slechts een controle groep nodig.

Indien een AMP niet het gewenste resultaat geeft zal het experiment nog een keer herhaald worden met een hogere dosis AMP. De AMP's die bij de eerste concentratie wel een goede reductie in bacteriële lading geven, zullen niet herhaald worden.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, welk ras/stam en welke sexe worden 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.

In dit protocol zal gebruik gemaakt gaan worden van BALB/c muizen van ongeveer 6-8 weken oud. De BALB/c muis is naast de C57BL/6 muis de meest gebruikte stam in immunologisch en microbiologisch onderzoek. Omdat de BALB/c muis gevoeliger is voor infecties dan de C57BL/6 muis is er voor de BALB/c stam gekozen (Munder *et al*, Microbes Infect 7(4):600 (2005)).

In dit onderzoek zullen mannetjes worden gebruikt. Dit is om variaties in de proef door de hormonale cyclus bij vrouwtjes te voorkomen.

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 ten behoeve van de proef
- ☐ euthanasie na afloop van de proef
- ☐ 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.

Vanwege de pathogeniciteit van biologische dreigings-agentia zullen de dieren worden gehuisvest in isolatoren (UNO, Zevenaar) die staan in de DMIII-faciliteit. Om de omgeving waarin de dieren zich bevinden verder zo steriel mogelijk te houden wordt als bedding bestraalde corn-cobs gebruikt, wat minder stof ontwikkelt dan zaagsel. Als kooiverrijking zullen er bestraalde krullen (BioServices) in de kooien aanwezig zijn. De dieren krijgen aangezuurd water en bestraald voer *ad libitum*. Ze zullen worden gehuisvest in groepsverband (n = 2 of 3). Omdat in dit experiment mannetjes gebruikt gaan worden is er een verhoogde kans op agressief gedrag. In geval van vechten zullen de dieren worden opgesplitst.

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.

In de dieren die gebruikt worden voor het opzetten van het screeningsmodel zal na een aantal dagen een infectie ontstaan die uiteindelijk zal leiden tot het overlijden van de muis. Infectie van muizen met *Y. pestis* leidt tot koorts (sepsis). Zichtbare symptomen zullen zijn de "roughness" van de vacht, respiratoire distress en lusteloosheid. Indien de dieren matig tot ernstig ongerief ondervinden van de infectie, zich uitende in zichtbare gewichtsafname en ernstige respiratoire distress, zullen de dieren uit de proef worden genomen.

De behandelde dieren zullen naar verwachting minder ongerief ondervinden dan de dieren uit de PBS controle groep omdat naar verwachting de AMP's de bacteriën doden en de ontwikkeling van een infectie bestrijden. Voor het afnemen van het bloed wordt een hartpunctie uitgevoerd. Hiervoor zullen de muizen verdoofd worden d.m.v. een *i.p.* injectie met Nembutal, dit zal gering tot matig ongerief met zich meebrengen. Na de hartpunctie wordt het dier geëuthanaseerd d.m.v. cervicale dislocatie en zullen de organen geïsoleerd worden.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	(be)handeling en effecten ³	Tijdsduur of frequentie ⁴	Verwachte mate van ongerief ⁵
1	3 (+3, +3)	I.v toediening <i>Y. pestis</i> wat zal leiden tot infectie	5 min (toediening) 4 d (infectie)	4
		Hartpunctie (anesthesie; <i>i.p.</i> Nembutal)	5 min (toediening anesthesie)	1
		Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	1 min	1

2F, 3F	12	I.v toediening <i>Y. pestis</i> wat zal leiden tot infectie	5 min (toediening) 4 d (infectie)	4
		I.v toediening PBS	5 min (toediening)	3
		Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal)	5 min (toediening anesthesie)	1
		Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	1 min	1
2A t/m 2E 3A t/m 3E	60	I.v toediening <i>Y. pestis</i> wat zal leiden tot infectie	5 min (toediening) 4 d (infectie)	3
		I.v toediening AMP	5 min (toediening)	3
		Hartpunctie (anesthesie; i.p. Nembutal)	5 min (toediening anesthesie)	1
		Euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie	1 min	1

Toelichting:

- Vermeld op 1 regel alle proefgroepen waarbij het ongerief naar verwachting gelijk zal zijn als gevolg van de beschreven (be)handeling (kolom 3).
- Vermeld het aantal dieren dat met de onder 1 aangegeven groepen gemoeid is.
- Vermeld (be)handeling overeenkomstig vraag 9 en 10, vermeld tevens effecten die het gevolg zijn van de (be)handeling en die ongerief kunnen veroorzaken.
- Tijdsduur wordt in uren, dagen, weken (resp u, d, w) uitgedrukt. Frequentie heeft betrekking op het aantal maal dat een (be)handeling wordt verricht (b.v. bloedmonsters, gavage).
- Vermeld het ongerief dat verwacht wordt bij de (be)handeling of het behandelresultaat.
Gebruik de codering:
Code 1: gering
Code 2: gering/matig
Code 3: matig
Code 4: matig/ernstig
Code 5: ernstig
Code 6: zeer ernstig
[Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.]
- Vermeld bij vraag 17 het ongerief dat verwacht wordt t.g.v. alle (be)handelingen en effecten, die de omschreven groep(en) ondervinden met gebruikmaking van de codes onder punt 5 code 1 t/m 5.

17. Geef een inschatting van het totale verwachte ongerief voor het proefdier

Op basis van de tabel onder vraag 16 wordt per groep het totale ongerief geschat.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
1, 2F, 3F	17 (+5, +5)	4
2A t/m 2E 3A t/m 3E	60	3

18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen? Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.

Voorafgaand aan de hartpunctie zullen de dieren verdoofd worden m.b.v. Nembutal. Het is niet mogelijk om meer pijn bestrijding toe te passen in de experimenten omdat dit onverenigbaar is met het resultaat van de proef.

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

Het tijdstip van orgaan isolatie bij de testgroepen wordt bepaald door het infectiemodel. Echter, indien de dieren uit de controle groep eerder dan op het bepaalde tijdstip een ernstig ziektebeeld vertonen zal het tijdstip van orgaan isolatie van alle dieren eerder worden uitgevoerd. Na overleg met Dr. [REDACTED] en Dr. [REDACTED]

_____, die beide veel praktische ervaring hebben met *Y. pestis* infectie in muizen, zullen we hiervoor de volgende criteria handhaven:

- Slecht klinisch beeld zich uitend in:
 - Zichtbare gewichtsafname
 - Gebogen houding
 - Ernstige futloosheid
 - Duidelijk zichtbare respiratoire distress

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.

De toxiciteit van de nieuwe AMP's zijn (of worden) op voorhand *in vitro* in kaart worden gebracht middels een haemolytische assay. Van uitsluitend de niet toxische AMP's zal het therapeutisch effect *in vivo* worden gemeten. Desondanks is het niet uit te sluiten dat een vermeend veilig AMP *in vivo* toch toxisch blijkt te zijn. Omdat de AMP's direct na de infectie met *Y. pestis* toegediend worden, zal de toxiciteit van een AMP zich voornamelijk uiten in een snellere progressie van het *Y. pestis* ziektebeeld. Deze dieren zullen uit de proef genomen worden op de criteria beschreven bij vraag 19

ALTERNATIEVEN

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

Het gebruik van dieren in dit onderzoeksplan is onontkoombaar omdat het gaat om het aantonen van een therapeutisch effect in het intacte dier, nadat dit effect al *in vitro* is aangetoond. Het is daarnaast goed mogelijk dat het opzetten van het infectiemodel minder dieren nodig zijn dan opgegeven indien in het infectiemodel de eerste concentratie binnen 4 dagen een duidelijk ziektebeeld vertoont..

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

Het gaat om bevestiging van behaalde *in vitro* resultaten *in vivo* in het intacte dier.

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

De AMP's zijn eerst *in vitro* getest, alvorens de dierproeven worden gestart. Alleen die AMP's die *in vitro* veelbelovende resultaten geven, zullen *in vivo* worden getest.

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

- ☐ TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. _____
- ☐ Art. 14 functionaris _____ tel _____
- ☐ Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)
- ☐ elders, n.l.:
- ☒ zo nee; waarom niet: Proefopzet zal vervolg zijn op alternatieve *in vitro* methode

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.

De experimenten met de AMP's die al bij de eerste concentratie een goede reductie in bacteriële lading geven, zullen niet herhaald worden met een hogere concentratie, waardoor de hoeveelheid dieren in experiment 3 lager uit kan vallen dan in de tabellen vermeld.

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

CFU: Colony Forming Units
AMP's: Anti Microbiële peptides

Onderzoeker

Management

datum:

datum:

Na behandeling ontvangt de vergunninghouder het advies van de DEC TNO. Kopie van dit advies gaat tevens naar management en onderzoeker