

2011-14

Datum ontvangst DEC: 4 augustus 2011

DEC nr: 3145 (pilot na 3140)

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

Dit formulier dient voor de uiterste inzendtermijn (zie Spider, cluster onderzoekers Art.9) volledig ingevuld **elektronisch** in het bezit te zijn van: [REDACTED]

E-mail: [REDACTED]

Postadres:

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

telefoon: [REDACTED]

Kerngebied en locatie:

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. titel: Pilot studie voor optimalisatie van het EAE model in de SJL muis

1.2. studienummer:

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

2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD): [REDACTED]

E-mail adres onderzoeker: [REDACTED]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr: [REDACTED]

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD): [REDACTED]
[REDACTED]

Externe samenwerking (indien van toepassing):

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: Begin september

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

Geplande duur van de onderzoeksplan: 2 wkn acclimatisatie en 15 dagen experimenteel

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	1	01	1	5	03	1	1	01	12	1	2	4	1
2	1	01	1	5	03	1	1	01	12	1	2	4	1
3	1	01	1	5	03	1	1	01	12	1	2	4	1
4	1	01	1	5	03	1	1	01	12	1	2	4	1
5	1	01	1	5	03	1	1	01	12	1	2	4	1
6	1	01	1	5	03	1	1	01	12	1	2	4	1

RELEVANTIE

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

De afgelopen jaren is binnen de afdeling Metabolic Health Research voor het testen van (potentiële) medicijnen voor MS met succes gebruik gemaakt van het muis EAE model (SJL). De inductie van EAE gebeurt door immunisatie van PLP en de ziekte incidentie na een dergelijke immunisatie is normaal gesproken hoger dan 80%.

Echter, het afgelopen experiment (DEC3069, experiment C) kenmerkte zich door een zeer lage incidentie (30%) en is vroegtijdig beëindigd. Een exacte reden voor deze lage incidentie is niet te noemen, wel is bekend dat in de zomerperiode de ernst van de ziekte verschijnselen (en daarmee de incidentie) vaak wat minder is. Een oorzaak die hierbij genoemd wordt is de seizoen afhankelijke samenstelling van het voer (Sniff).

Een andere mogelijkheid is dat de ingebruikname van de nieuwe dierfaciliteit van invloed is geweest op de kwaliteit van de ziekte inductie en daarnaast kan, ondanks alle uitgebreide kwaliteit controles, de nieuwe batch PLP de oorzaak zijn van tegenvallende resultaten.

Na correspondentie met de DEC (vraagbrief DEC3140) en op basis van het bovenstaande is besloten een pilot experiment uit te voeren waarvan het resultaat inzicht moet verschaffen over de reden van de tegenvallende ziekte inductie. Hierbij zullen m.b.t. de ziekte inductie de resultaten in de 'oude' en de 'nieuwe' dierfaciliteit met elkaar worden vergeleken. Ook zal de huidige batch PLP (2 concentraties) worden vergeleken met een PLP batch waarvan de werkzaamheid al in eerdere experimenten is aangetoond.

Een zesde groep muizen zal worden gebruikt om het effect van Teklad voer te bepalen op het verloop van ziekte ("onset of disease" / incidentie). Teklad voer is een veel meer gestandaardiseerd en veel minder seizoensafhankelijk voer dan het huidig gebruikte (Sniff) voer. Omdat het tevens de bedoeling is dat Teklad voer als standaard voer in de nieuwe dierfaciliteit in te voeren, is dit een extra reden om het effect van dit voer op het EAE model uit te testen.

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

Het muizenmodel Experimentele Autoimmuun Encephalomyelitis (EAE), wordt wereldwijd gebruikt als de beste dierexperimentele benadering van de ziekte multipale

sclerose (MS). MS is een aandoening van het centraal zenuwstelsel die het gevolg is van een auto-immuun reactie gericht tegen determinanten van verschillende myeline-eiwitten. Deze reactie wordt gekenmerkt door locale ontstekingshaarden in het centrale zenuwstelsel, die verantwoordelijk zijn voor verminderde zenuwgeleiding en uiteindelijk verlamingsverschijnselen. MS is een ernstige verlamingsziekte die zich in de regel op jong volwassen leeftijd openbaart. De aandoening komt vooral in de Westerse landen voor en heeft daar een prevalentie van 0.1 %.

De Sponsor wil een generiek voor [REDACTED] op de markt brengen ([REDACTED]). Een eis van de FDA voor vrijgave voor gebruik in de kliniek is dat de werkzaamheid van [REDACTED] getest moet zijn in een muismodel voor MS (EAE-model).

6.a.2 Economisch belang

Het chronische karakter van de ziekte en de toenemende mate van invaliditeit brengt met zich mee dat deze categorie patiënten in toenemende mate arbeidsongeschikt worden en een beroep doen op daarmee gepaard gaande uitkeringen.

6.a.3 Milieu belang

N.v.t.

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

Het langdurige chronische karakter van de ziekte is in toenemende mate belastend (zowel fysiek als psychisch) niet alleen voor de patiënt maar ook voor de directe familie / verzorgenden.

6.b Wetenschappelijk belang:

Sinds enkele jaren zijn geneesmiddelen ([REDACTED] en [REDACTED]) voorhanden die bijdragen tot vertraging van progressie van de ziekte Multiple Sclerose (MS). Ze brengen ca. 30 % reductie van ziekte-ernst en -progressie teweeg. Deze geneesmiddelen zijn vrijwel alleen actief gedurende het vroege inflammatoire ziekteproces, wanneer nog veel exacerbaties en remissies optreden (relapsing-remitting MS). Er is een grote behoefte aan nieuwe medicijnen welke actief zijn gedurende een latere fase in het ziekteproces.

Het doel van de huidige sponsor is om voor de behandeling van MS, [REDACTED] op de markt te brengen. [REDACTED] wat op dit moment door [REDACTED] wordt geproduceerd en voor de behandeling van MS in de kliniek wordt toegepast. Op dit moment wordt door de sponsor een aantal grote batches [REDACTED] geproduceerd die door TNO in het EAE model op werkzaamheid zijn uitgetest (eis FDA).

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?

Het voorstel beoogt het identificeren van geneesmiddelen; het onderliggende werkingsmechanisme is secundair aan de vraagstelling. Van belang is dat het model voldoende geschikt is voor het identificeren van dit soort verbindingen. Dit is in eerdere

studies bij de Divisie Biomedical Research aangetoond (Gerritse et al., *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 93 : 2499-2504, 1996; Nagelkerken et al. *Int.Immunol.* 9 : 1243-1251, 1997; Nagelkerken et al. *J.Immunol.*, 2004; Luca et al., *J.Neuroimmunol.* , 2005)

PROEFOPZET

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

- ☒ nieuw onderzoeksplan (ook bij gebruik van bestaande modellen met nieuwe behandeling/teststof)
- ☐ herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan , DECnr.:
- ☐ 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 standaardstudieplan voor de nadere uitwerking.

Dag 0: 75ug PLP₁₃₉₋₁₅₁ in een emulsie met water en Compleet Freund's Adjuvant aangevuld met *M.tuberculosis* H37RA. Subcutaan verdeeld over 4 plaatsen op de flanken.

Dag 1: intraveneus 10⁹ heat-killed *B.pertussis* organismen

Dag 3: intraveneus 10⁹ heat-killed *B.pertussis* organismen

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1 'oude' faciliteit PLP batch A (old), 75 µg/mouse	Immunisatie met 75ug PLP op dag 0 <i>B.pertussis</i> op dag 1 en 3	Subcutane immunisatie Intraveneuse toediening	5	♀♀
2 'oude' faciliteit PLP batch B (new), 75 µg/mouse	Immunisatie met 75ug PLP op dag 0 <i>B.pertussis</i> op dag 1 en 3	Subcutane immunisatie Intraveneuse toediening	5	♀♀
3 'nieuwe' faciliteit PLP batch A (old), 75 µg/mouse	Immunisatie met 75ug PLP op dag 0 <i>B.pertussis</i> op dag 1 en 3	Subcutane immunisatie Intraveneuse toediening	5	♀♀

4 'nieuwe' faciliteit PLP batch B (new), 75 µg/mouse	Immunisatie met 75ug PLP op dag 0 <i>B.pertussis</i> op dag 1 en 3	Subcutane immunisatie Intraveneuse toediening	5	♀♀
5 'nieuwe' faciliteit PLP batch B (new), 100 µg/mouse	Immunisatie met 75ug PLP op dag 0 <i>B.pertussis</i> op dag 1 en 3	Subcutane immunisatie Intraveneuse toediening	5	♀♀
6 'nieuwe' faciliteit PLP batch A (old) Teklad voer	Immunisatie met 75ug PLP op dag 0 <i>B.pertussis</i> op dag 1 en 3	Subcutane immunisatie Intraveneuse toediening	5	♀♀

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.

Totaal worden 30 dieren gebruikt, verdeelt over 6 groepen.

Elke groep bestaat uit 5 muizen. Omdat de beoogde incidentie minimaal 80% moet zijn houdt dat in dat minimaal 4 van de 5 dieren ziek moeten worden. Wanneer de incidentie in geen van de groepen hoger is dan 80% zal verdere validatie nodig zijn.

Het experiment bestaat uit 6 groepen. Dit maakt het mogelijk om de resultaten van de oude en de nieuwe faciliteit te vergelijken terwijl tevens zowel de oude als de nieuwe batch PLP wordt uitgetest. Van de nieuwe batch zal naast een dosis van 75 µg ook een dosis van 100 µg worden uitgetest (bepaling optimale dosis). Groep 6 zal bestaan uit dieren die worden gehuisvest in de nieuwe faciliteit, geïmmuniseerd met de oude batch PLP (75 µg) en waarbij Teklad als voer wordt gebruikt.

Een studieduur van 15 dagen is voldoende om een antwoord te krijgen met betrekking tot incidentie en "day of onset".

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.

SJL muis. De keuze van deze muis is gebaseerd op het feit dat in deze stam ziekte kan worden geïnduceerd met een gedefinieerd synthetisch peptide van proteolipide protein. De keuze voor vrouwelijke dieren is gebaseerd op een grotere gevoeligheid voor auto-immuunziekten in vergelijking met mannelijke dieren.

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 d.m.v. CO₂/O₂ inhalatie
- ☐ 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.

- Huisvesting clean conventioneel; groepsgewijs in type 3 bakken
- Voedsel Sniff, ad libitum
- Water pH2.8 (oude faciliteit), geautoclaveerd (nieuwe faciliteit), ad libitum
- Kooiverrijking Bestraald *Enviro dry*

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.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	(be)handeling en effecten ³	Tijdsduur of frequentie ⁴	Verwachte mate van ongerief ⁵
alle	30	immunisatie	1x	4
alle	30	B.pertussis iv	2x	3
alle	30	Ontwikkeling ziekte	5 dagen	5
alle	30	Euthanasie dmv O ₂ /CO ₂	1x	1

Toelichting:

- 1 Vermeld op 1 regel alle proefgroepen waarbij het ongerief naar verwachting gelijk zal zijn als gevolg van de beschreven (be)handeling (kolom 3).

- 2 Vermeld het aantal dieren dat met de onder 1 aangegeven groepen gemoeid is.
- 3 Vermeld (be)handeling overeenkomstig vraag 9 en 10, vermeld tevens effecten die het gevolg zijn van de (be)handeling en die ongerief kunnen veroorzaken.
- 4 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).
- 5 Vermeld het ongerief dat verwacht wordt bij de (be)handeling of het behandel-effect.
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.]
- 6 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
alle	30	5 (ontwikkeling EAE)

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 strijdig met proef.

Zieke dieren worden zolang mogelijk in hun eigen groep gehuisvest en krijgen vrij toegang tot water en voedsel. Hiervoor worden drinkflessen gebruikt voorzien van lange drinknippels en op het moment van score 2.5 wordt een bakje met natte voedselpellets in de bak gezet.

Dieren krijgen vanaf score 2.5, 2 maal daags maximaal 0.5 ml fysiologisch zout toegediend. De frequentie en volume is afhankelijk van de gezondheidstoestand en wordt bepaald door de art. 12 functionaris.

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

Dieren worden dagelijks beoordeeld op ziekteontwikkeling en herstel. Ziekte wordt uitgedrukt in een "disability scale" van 0 (= niet ziek) tot 5 (=dood). Indien een score van 4 (=moribund) langer dan 8 uur wordt geconstateerd zal worden overgegaan tot euthanasie. Muizen die een snel herstel vertonen blijven op deze wijze betrokken in het experiment.

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.

Bijkomende risico's zijn niet te voorzien.

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 (doel van de proef), waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:

Er zijn geen geschikte alternatieven voor dit ziektemodel voorhanden.

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

Zie punt 23

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

☐ TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. [REDACTED]

☒ Art. 14 functionaris ([REDACTED])

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

☐ elders, n.l.:

☐ zo nee; waarom niet:

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.

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

Het is een eis van de FDA dat, voordat een generiek van [REDACTED] in de kliniek gebruikt gaat worden, deze op effectiviteit getest moet zijn in het muizen EAE model. Dit geldt voor elke nieuwe batch [REDACTED]

Op dit moment wordt, naast het uittesten van de verschillende batches in het *in vivo* testsysteem, dezelfde batches ook uitgetest in een nieuw opgezet *in vitro* test systeem. De resultaten van beide testsystemen zullen worden verzameld (dossier vorming) en in de

toekomst gebruikt worden als onderbouwing van een mogelijke alternatieve *in vitro* methode ter vervanging van de huidige, geaccepteerde *in vivo* test methode.

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

PLP: proteolipide proteïn

EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis

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.