



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.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- 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.

Fibrose is een pathologisch proces waarbij een overmatige vorming van fibreus bindweefsel in organen of weefsels optreedt. Fibrose kan gezien worden als een uit de hand gelopen wondhelingsproces, waarbij er een dusdanig zeer sterke ophoping van bindweefsel kan optreden dat het normaal functioneren van het orgaan niet meer mogelijk is. Hierdoor kan fibrose tot ernstige gezondheidsproblemen leiden en heeft levensbedreigende aspecten als het bijvoorbeeld de long, lever of nier betreft. Hoewel de klinische noodzaak om fibrose te kunnen behandelen overduidelijk is (er wordt geschat dat in 45% van alle sterfgevallen fibrose een rol heeft gespeeld) waren er tot enkele jaren geleden geen behandelmethoden beschikbaar.

Met het op de markt komen van twee (zij het nog maar zeer matig effectieve) medicijnen tegen longfibrose (Pirfenidone door Roche en Nintedanib door Boehringer Ingelheim) is het fibrose onderzoek de afgelopen jaren in een enorme stroomversnelling geraakt. Zowel binnen de farmaceutische industrie als binnen de academia worden momenteel nieuwe medicijnen ontwikkeld die de hoop bieden dat binnen afzienbare tijd nieuwe therapiemogelijkheden beschikbaar komen. Dit wordt ondersteund door het feit dat hoewel er grote verschillen tussen de organen kunnen zijn in factoren die fibrose kunnen veroorzaken, er een grote overlap in de processen is als het fibroseproces eenmaal op gang is. Dit betekent dat bijvoorbeeld een therapie die ontwikkeld is voor de behandeling van longfibrose vaak ook effect in andere orgaanfibroses kan hebben.

Een essentiële stap in het testen van nieuwe farmaca is het aantonen van effectiviteit in een preklinische setting voordat ze in een klinische fase verder getest zullen gaan worden. TNO heeft de afgelopen 15 jaar een breed portfolio van *in-vivo* en *in-vitro* modellen ontwikkeld waarin we fibrose in verschillende organen kunnen nabootsen. Middels ons portfolio ondersteunen wij zowel de farmaceutische industrie als de academische wereld bij het zo goed mogelijk testen van nieuwe therapie mogelijkheden. Omdat het onderzoek naar nieuwe anti-fibrotische therapieën nog een relatief jong onderzoeksveld is, vinden er voortdurend verbeteringen aan modellen en uitleesmogelijkheden plaats. Wij streven ernaar om deze zo goed mogelijk in ons portfolio te incorporeren om daarmee een zo optimaal mogelijk preklinisch palet aan te bieden.

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?

Het hoofddoel van dit project is het testen van nieuwe anti-fibrotische therapie mogelijkheden in state-of-the-art long-, huid-, lever en/of nier fibrosemodellen die zo goed mogelijk bijdragen aan het voorspellen van de uiteindelijke klinische effectiviteit.

Om dit mogelijk te maken zijn de volgende subdoelen in dit project geïntegreerd:

- Continue validatie en verdere optimalisatie van de modellen (bijvoorbeeld door het toevoegen van extra read-out mogelijkheden, het uittesten van nieuwe toedieningsstrategieën, het ontwikkelen van meer chronische varianten van onze modellen om daarmee de humane klinische situatie beter te benaderen en het uittesten van potentiële nieuwe positieve controles).
- Ontwikkelen van kennis over het fibrotische proces in de verschillende modellen (bijvoorbeeld het volgen van de fibroseontwikkeling in de tijd of het vergelijken van fibrotische processen tussen dier en mens om daarmee optimale translatie mogelijk te maken).

Dit project heeft een hoge haalbaarheid:

TNO heeft een zeer uitgebreid track record op dit gebied. Onderzoekers binnen de groep zijn al meer dan 20 jaar werkzaam op het gebied van extracellulaire matrix aanmaak en afbraak. Daarnaast heeft TNO sinds 10 jaar een uitgebreid programma op het onderzoeken en testen van nieuwe anti-fibrotische

therapie mogelijkheden. Hierbij is een groot netwerk binnen zowel de academische wereld als binnen de farmaceutische industrie opgebouwd. Binnen dit netwerk hebben we de afgelopen 10 jaar meer dan 50 samenwerkingsprojecten (zowel bilateraal als in grotere consortia) uitgevoerd.

3.3 Belang

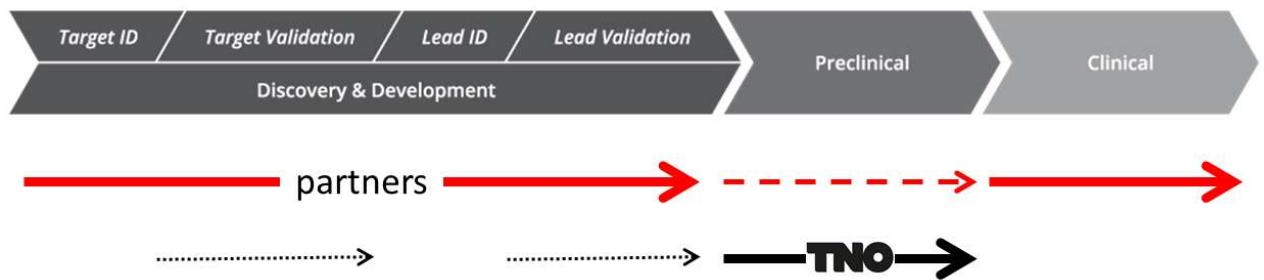
Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Er is géén therapie beschikbaar ter voorkoming van fibrose, terwijl de behandeling met de momenteel beschikbare farmaca slechts matig effectief is in zowel de patiënt als in de muis. Fibrose is een chronische aandoening die tot ernstige gezondheidsproblemen kan leiden en heeft levensbedreigende aspecten als het de long, lever of nier betreft. Hoewel de klinische noodzaak om fibrose te kunnen behandelen overduidelijk is (45% van alle mortaliteit heeft een fibrotische component) zijn er nog nauwelijks goede behandelmethoden beschikbaar. Bovenstaande doelstellingen zullen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen tegen fibrose. Deze zullen leiden tot een aanzienlijke verbetering en verhoging van de kwaliteit van leven, enorme kostenbesparing in de zorg en meer arbeidsparticipatie van fibrosepatiënten. Om dit mogelijk te maken is het essentieel dat de bestaande wetenschappelijke kennis over het ontstaan van fibrose en de daarvoor verantwoordelijke processen verder uit te breiden. Longfibrose wordt gekenmerkt door kortademigheid, infiltraten (te zien op röntgenfoto) en ontsteking/fibrosis. Als de longfunctie vermindert neemt de sterfte toe. 50-70% van de patiënten met longfibrose sterft binnen 5 jaar na de diagnose. Per jaar worden 12 op de 100.000 mensen gediagnostiseerd met idiopathische longfibrose. Leverfibrose wordt vaak gezien in obese of hepatitis B of C besmette patiënten. Het duurt jaren voordat de ziekte zich ontwikkelt en klinische signalen worden herkend. 10 tot 20% van alle patiënten gediagnostiseerd met leverfibrose zullen uiteindelijk sterven aan cirrose of leverkanker als er niet wordt overgegaan op een levertransplantatie. Bij 25% van de hepatitis geïnfekteerde patiënten met een levertransplantatie keert de fibrose/cirrose weer terug. Wereldwijd lijden 400 miljoen mensen aan leverfibrose. Chronisch nierfalen kan ontstaan door meerdere oorzaken, zoals diabetes of hypertensie. Eén van de kenmerken van eindstadium nierfalen is de ontwikkeling van fibrose in de verschillende compartimenten in de nier. Wanneer de nier is beschadigd, ontstaat een ontsteking die zich kan ontwikkelen tot 'end stage' nierfibrose. De ontstane nefropathie veroorzaakt veel sterfte binnen de diabetes en obese patiënten populatie. Er is geen goede therapie voor nierfalen en de enige behandeling die op dit moment werkt is dialyse of niertransplantatie. Helaas is dit geen lange termijn oplossing. Geschat wordt dat in 2020 drie miljoen Nederlanders diabetes hebben, 44% van deze patiënten zal nefropathie en leverpathologie ontwikkelen. Ook huidfibrose (bijvoorbeeld in het ziektebeeld systemische sclerodermie of na verbranding) kan leiden tot ernstige gezondheidsproblemen. In handen en gezicht komt deze ziekte het meest voor. Samentrekking van bindweefsel kan daar leiden tot een sterk verlies van functie in de hand en de mond.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het ontwikkelen van nieuwe therapeutica verloopt volgens een vast stramien:



Allereerst worden er geschikte targets geïdentificeerd op basis van bijvoorbeeld literatuur, humane studies en/of *in vitro* testen. Vervolgens wordt gevalideerd of modificatie van het target inderdaad tot verandering van pathologie kan leiden (bv *in vitro* testen, *ex vivo* testen met humaan weefsel, *in vivo* testen in transgene dieren). Hierna worden stoffen (leads) ontwikkeld die het target kunnen beïnvloeden (bv remmende antilichamen, small molecules, RNA therapie) en worden deze leads gevalideerd (welke stof is het meest potent, hoe is de oplosbaarheid, hoe specifiek is de stof). De meest veelbelovende kandidaten gaan vervolgens door naar de preklinische testfase, waarin wordt onderzocht of de kandidaat stoffen goed genoeg zijn om in de mens getest te worden (klinische fase). Het ultieme doel hierbij is natuurlijk dat stoffen die ook de klinische fase met succes doorlopen als nieuwe therapie zullen worden toegelaten.

TNO ondersteunt als Research and Technology Organization (RTO) al jaren zowel de farmaceutische industrie als academische partners bij het uitvoeren en optimaliseren van preklinisch onderzoek op het gebied van fibrose. Omdat het uitvoeren van dit soort onderzoek bij TNO goed gevalideerd is en het vaak om specialistische modellen gaat, kiezen veel partners ervoor dit soort onderzoek in samenwerking te doen in plaats van zelf uit te voeren. Belangrijk hierbij is te realiseren dat het voor partners vaak van even groot belang is om te leren dat een stof niet werkt (en dus niet door kan naar de klinische fase) als om aan te tonen dat een stof wel werkt. Het overgrote deel van het werk onder dit project valt in de preklinische fase, maar werk op het gebied van target validatie (bv aantonen dat een pathway betrokken is in fibrose d.m.v. het gebruik van transgene dieren) of lead validation (bv vergelijken van verschillende varianten van een nieuwe stof om daarna te kunnen kiezen welke stof verder ontwikkeld zal worden) vindt ook plaats.

Voor het testen van nieuwe geneesmiddelen die de fibrosevorming verminderen, maken wij gebruik van 4 diersmodellen. Uit uitgebreide literatuurstudie en na intensieve consultatie met farmaceutische partijen en academische partners is naar voren gekomen dat deze modellen op dit moment het best gevalideerd en geaccepteerd zijn (ook door de FDA) voor het preklinisch testen van nieuwe therapie mogelijkheden. Het betreft hier de volgende modellen:

- Bleomycine-geïnduceerde longfibrose
- Bleomycine-geïnduceerde huidfibrose
- CCl₄-geïnduceerde leverfibrose
- Ureter obstructie geïnduceerde nierfibrose

Het overgrote deel (>80%) van de studies die onder deze projectaanvraag zullen worden uitgevoerd zullen effectiviteit studies zijn waarin nieuwe therapeutica worden getest. Dit zal in samenwerking met of in opdracht van externe partners plaatsvinden. Voor elke individuele studie wordt uitgebreid met de betreffende partner overlegd over het optimale studiedesign. Er wordt altijd aan de partner gevraagd wat er al bekend is van het te testen middel, om zo onnodig proefdier gebruik te voorkomen. TNO heeft voor verschillende modellen uitgebreide datasets beschikbaar waarin kan worden gekeken of de targets inderdaad betrokken zijn. Verder komen hierbij ook aspecten als keuze van het meest geschikte model (meestal gebaseerd op het werkingsmechanisme of het toepassingsgebied), de experimentele opzet, de toedieningsroute, de behandelingsfrequentie, de poweranalyse, de concentratie keuze, de uitleesparameters, etc. aan de orde.

Hoewel bovenstaande modellen op dit moment het meest geschikt geacht worden voor het testen van nieuwe therapie mogelijkheden betekent dit niet dat er geen knelpunten binnen het fibrose onderzoek meer zijn. Daarom zullen de resterende studies die onder deze projectaanvraag zullen worden uitgevoerd zich richten op het continue verder verbeteren van deze modellen. De hoofdknelpunten waar we op ons zullen

richten zijn:

- Verbeteren reproduceerbaarheid en verbeteren validatie van de modellen: in de uitgebreide literatuur over deze modellen worden veel varianten gebruikt die niet allemaal gelijkwaardig zijn. In het verleden hebben we de reproduceerbaarheid van het longfibrose model al sterk kunnen verbeteren door de toedieningsroute van bleomycine te veranderen van intratracheale injectie naar oropharyngeale toediening. We proberen continue de modellen te verbeteren en tegelijkertijd de modellen zo goed mogelijk te valideren. Hier zal onder andere ook worden gekeken of het mogelijk is om verschillende modellen te combineren (inductie van longfibrose in het huidfibrosemodel), zodat er meer kennis met minder dieren kan worden gegenereerd.
- Verbeteren van beschikbare uitleesparameters: veel van de klassieke uitleesparameters zijn gericht op het meten van het collageen eiwit (histologie, biochemische analyses). Deze hebben als nadeel dat ze vaak weinig onderscheidend zijn (de therapie werkt/werkt niet). Wij richten ons daarom ook op meer gevoelige methodes die de processen beter in kaart kunnen brengen (bijvoorbeeld -omics benaderingen). Hiermee hopen we in de toekomst verschillen tussen nieuwe therapiemogelijkheden beter te kunnen differentiëren. Daarnaast heeft het ontwikkelen van nieuwe uitleesparameters die het beter kunnen bepalen van werkzaamheid in een therapeutisch behandelprotocol kunnen versterken. In het verleden hebben we hier al stappen kunnen zetten door het toepassen van zwaar water labeling van nieuw collageen.
- Verbeteren van kennis over het fibroseproces in muis en rat en het vergelijken van deze processen met het humane ziektebeeld. Deze kennis zal gebruikt worden om beter te kunnen onderzoeken wat de overlap en de verschillen tussen de model ziekte en het humane ziekteproces te kunnen bepalen. Hiermee zal een verbeterde translatie naar de kliniek kunnen plaatsvinden. Daarnaast zal deze kennis worden gebruikt om beter advies te kunnen geven over de opzet van de proeven. Zo zal bijvoorbeeld meer gedetailleerde kennis over het tijdsverloop van de modellen kunnen bijdragen aan een beter ontwerp van een therapeutisch regime (bv bepalen wat het optimale moment om te starten van een behandeling gebaseerd op kennis van het werkingsmechanisme van de nieuwe therapie).

Bij vraag D van de verschillende bijlagen zijn voorbeeldstudies gegeven om duidelijker te maken op welk gebied deze verbeteringen kunnen liggen.

Alle studies worden uitgevoerd conform de richtlijnen van de "good practice guide" (van Diehl *et al*, J Appl Toxicol. 2001 Jan-Feb;21(1):15-23.) en worden voor aanvang eerst door de IvD getoetst.

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) Testen van nieuwe anti-fibrotische therapieën
Binnen ons netwerk (farmaceutische industrie, academische partners) worden veel nieuwe behandel mogelijkheden voor fibrotische aandoeningen ontwikkeld. Veel van onze partners hebben zelf niet de kennis/capaciteit in huis om deze nieuwe therapieën op effectiviteit te testen en maken gebruik van onze expertise om deze testen uit te voeren. Therapieën die worden ontwikkeld zijn o.a. small molecules, antilichamen, celtherapie, antisense technologieën. Daarnaast kan bijvoorbeeld het belang van een bepaalde pathway worden onderzocht door gebruik te maken van transgene dieren, dit kan vooral van belang zijn als er nog geen andere mogelijkheden zijn om deze pathways te moduleren.
- 2) Instandhouding lopende diermodellen
De batches bleomycine die wij gebruiken voor het induceren van huid of longfibrose hebben een verschillende werkzaamheid. Dit betekent dat bij elke nieuwe batch bepaald moet worden bij welke concentratie het fibrose inductie window voldoende hoog is. Voor de huid en longfibrose modellen worden verschillende batches gebruikt. De gevoeligheid varieert ook per species en potentieel per stam. Afhankelijk van het aantal daadwerkelijk uitgevoerde studies zal er naar schatting elke 3 jaar een nieuwe batch getest moeten worden.
- 3) Verbetering modellen/read-outs
Op basis van contacten binnen ons uitgebreide netwerk, de nieuwste literatuur en ons eigen programma gericht op het continu aanbrengen van verbetering in de modellen, zal er steeds worden gestreefd met zo min mogelijk dieren en zo min mogelijk ongerief maximaal inzicht te krijgen in het ontwikkelen van nieuwe therapieën.

Hierbij zullen onder andere de volgende vragen worden geadresseerd:

- Is het mogelijk de milde longfibrose die in het huidfibrose model optreedt meer consistent tot expressie te laten komen zodat beide pathologieën in hetzelfde model kunnen worden onderzocht? (Zodat niet twee afzonderlijke modellen hoeven worden uitgevoerd, dit geeft vermindering van aantallen dieren in studies).
- Is het mogelijk het transiënte fibroseproces in het longfibrose model met behulp van meerdere inductiemomenten meer de humane ontwikkeling te laten doormaken? Zo ontstaat een meer chronisch dan acuut longschade model, dit is beter transleerbaar naar de kliniek.
- Verfijning van toedieningsmogelijkheden. Bijvoorbeeld de manier van het induceren van de fibrose, of het systemisch toedienen van therapeutica.

4) Verdere ontwikkeling kennis over modellen

Meer beschikbare kennis over de modellen draagt bij aan het optimaliseren van het studiedesign voor het testen van nieuwe therapeutica.

Voorbeelden hiervan zijn:

* Bepaling van werkzaamheid van erkende referentiestoffen

* Het maken van een transcriptoom database door de tijd heen; hierin kunnen partners voordat ze een dierstudie gaan inzetten controleren of hun nieuwe targets wel in de modellen voorkomen: dit geeft uiteindelijk vermindering van het aantal dierproeven.

* Ontwikkelen van meer kennis over eventuele herstelprocessen die plaatsvinden na fibrose inductie; dit geeft meer inzicht of het mogelijk is om fibrose daadwerkelijk te genezen ipv de verdere ontwikkeling te remmen.

* Hoe is het microbioom betrokken bij de ziekte?

* biomarkers zoeken in plasma die voorspellend zijn voor de mate van fibrosevorming

*Vergelijking van de gegeneerde data uit de diermodellen met humane longfibrose patiënt gegevens, om zo de voorspelbaarheid vanuit de modellen naar de kliniek te optimaliseren.

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.

Alle onderdelen van deze projectaanvraag zijn erop gericht om zo optimaal mogelijk (maximale voorspelbaarheid naar de kliniek gecombineerd met minimaal proefdiergebruik) te beoordelen of nieuwe therapieën preklinische effectiviteit laten zien en daarmee geschikt zijn voor verdere klinische ontwikkeling. Hierbij wordt gebruik gemaakt van vier verschillende diermodellen voor fibrose die tezamen het overgrote deel van de humane klinische ontwikkelingsgebieden afdekken.

Door een proces van voortschrijdende validatie en verdere doorontwikkeling wordt ernaar gestreefd om te allen tijde de best mogelijke studiedesigns te kunnen aanbieden.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Longfibrose in muis of rat
2	Nierfibrose in muis of rat
3	Huidfibrose in muis of rat
4	Leverfibrose in muis of rat
5	
6	
7	
8	
9	
10	