



Formulier

Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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 2.1 aangekruiste categorieën.

Fibrose is een pathologische vorm van ontregelde wondheling waarbij normaal parenchymaal weefsel wordt vervangen door fibreus bindweefsel. Fibrose kan gezien worden als een uit de hand gelopen wondhelingsproces, waarbij er een dusdanig sterke ophoping van bindweefsel kan optreden dat het

normaal functioneren van het orgaan bemoeilijkt wordt of zelfs tot functieverlies van het orgaan kan lijden. Hierdoor kan fibrose tot ernstige gezondheidsproblemen leiden en kan het levensbedreigend worden 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), zijn behandelmethoden maar zeer beperkt beschikbaar.

Omdat de diagnose van fibrose meestal pas laat gesteld wordt (fibrose doet geen pijn en de diagnose vindt pas plaats bij (forse) vermindering van orgaanfunctie) kunnen lifestyle veranderingen niet meer helpen om het eenmaal in gang gezette proces te stoppen.

Met het op de markt komen van twee medicijnen tegen longfibrose (Pirfenidone door Roche, toegelaten in de EU in 2011, en Nintedanib door Boehringer Ingelheim in de EU in 2015) is het fibrose onderzoek in een stroomversnelling geraakt, vooral omdat het paradigma dat fibrose onbehandelbaar zou zijn onjuist bleek te zijn. Omdat beide medicijnen ernstige bijwerkingen hebben, worden ze op dit moment alleen in de behandeling van longfibrose ingezet (zonder behandeling is de mediane levensverwachting in longfibrose patiënten slechts 2,5 jaar) en is er nog steeds een enorme behoefte aan nieuwe therapeutica die ook andere soorten fibrose kunnen behandelen of die longfibrose beter kunnen behandelen dan de bestaande medicijnen.

Zowel binnen de farmaceutische industrie als binnen de academische wereld wordt volop gewerkt aan de ontwikkeling van nieuwe medicijnen. Een eerste essentiële stap hierin is het aantonen van effectiviteit in een preklinische setting voordat deze medicijnen in een klinische fase verder getest zullen gaan worden. Echter zijn er tot nu toe uit de vele klinische trials maar weinig nieuwe medicijnen bijgekomen. Het op de markt brengen is een lang proces, vele nieuwe medicijnen zitten in de pijplijn, maar veel medicatie faalt ook.

TNO probeert het ontwikkelen van nieuwe therapeutica te versnellen en dit proces te ondersteunen met het aanbieden van verschillende *in vitro* en *in vivo* modellen. We bieden modellen aan die zo voorspellend mogelijk zijn in de mens.

TNO heeft de afgelopen 20 jaar een breed portfolio van *in-vivo* en *in-vitro* modellen ontwikkeld waarin we fibrose in long, lever, huid en nier 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. Inmiddels hebben we al meer dan 100 studies en bilaterale samenwerkingen gehad in dit veld. Omdat data wordt gegenereerd in het kader van "Business-to-Business" kan TNO de data meestal niet publiceren.

De rol van TNO is om de studies zo goed mogelijk af te leveren en de preklinische data te genereren zodat de sponsor het juiste besluit kan nemen of nieuwe stoffen door kunnen stromen naar een klinische trial. Er wordt progressie in het onderzoek verwacht, maar het uitblijven van een therapeutisch effect kan ook een uitkomst zijn van de uitgevoerde studie. 10% van de geteste therapeutica stroomt maar door naar de klinische fase.

Een nieuwe strategie die we steeds vaker tegenkomen is de combinatie therapie bestaande uit 2 of meerdere experimentele therapeutica.

Omdat het onderzoek naar nieuwe anti-fibrotische therapieën nog een relatief jong onderzoeksveld is, vinden er ook voortdurend verbeteringen aan modellen en uitleesmogelijkheden plaats. TNO wil bijdragen aan het verbeteren van anti fibrose therapieën en meer inzicht krijgen in de pathologie van fibrose en daarom optimaliseren we continu onze modellen en ontwikkelen we nieuwe read-out mogelijkheden. Zo kunnen we de meest optimale modellen in ons portfolio incorporeren om daarmee een zo optimaal mogelijk preklinisch palet aan te bieden.

Literatuur:

- Lagares, D., & Hinz, B. (2021). Animal and Human Models of Tissue Repair and Fibrosis: An Introduction. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2299, 277–290.
- Błyszczuk, P., Kozłova, A., Guo, Z., Kania, G., & Distler, O. (2019). Experimental Mouse Model of Bleomycin-Induced Skin Fibrosis. *Current Protocols in Immunology*, 126(1), e88.

- Chaudhary NI, Roth GJ, Hilberg F, Müller-Quernheim J, Prasse A, Zissel G, Schnapp A, Park JE. Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis. *Eur Respir J* 2007;29:976–985
- Conte E, Gili E, Fagone E, Fruciano M, Iemmolo M, Vancheri C. Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- β -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. *Eur J Pharm Sci* 2014;58:13–19
- Didiasova M, Singh R, Wilhelm J, Kwapiszewska G, Wujak L, Zakrzewicz D, Schaefer L, Markart P, Seeger W, Lauth M, et al. Pirfenidone exerts antifibrotic effects through inhibition of GLI transcription factors. *FASEB J* 2017;31:1916–1928
- Walters, D. M., & Kleeberger, S. R. (2008). Mouse Models of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Current Protocols in Pharmacology*, 40(1), 5.46.1-5.46.17.
- White, E. S., Thomas, M., Stowasser, S., & Tetzlaff, K. (2022). Challenges for Clinical Drug Development in Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 13.

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Het uiteindelijke doel van dit project is bij te dragen aan het ontwikkelen van nieuwe behandelmethoden voor fibrose. Eén van de belangrijkste manieren waarop dit gebeurd is het testen van de werkzaamheid van nieuwe stoffen in de onder beschreven diersystemen. Hierbij is het van belang te realiseren dat een indicatie van niet-werkzaamheid voor onze farma-klanten net zo belangrijk is als een indicatie dat de stof wel werkzaam is. Het vroegtijdig herkennen van niet-werkzaamheid wordt gezien als een essentiële stap in het terugdringen van de extreem hoge ontwikkelkosten van nieuwe medicijnen.

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

Een tweede direct doel van dit project is het continue verbeteren van onze modellen (oa testen nieuwe read-outs, andere behandelingschema, nieuwe model varianten) zodat wij onze opdrachtgevers steeds de allerbeste modellen kunnen aanbieden.

Niet alleen het testen van nieuwe therapeutica, maar ook het bestuderen van de rol van bepaalde pathways in het fibrose proces willen we verder onderzoeken. Zo kunnen we beter besluiten of deze geschikt zijn voor toekomstige medicijnontwikkeling. Pathways kunnen behalve door nieuwe medicijnen ook beïnvloed worden met si-RNA, virussen of door gebruik te maken van transgene dieren waarin bepaalde genen uit- of ingeknoekt zijn.

We beschrijven in dit project beste fibrose modellen die er op dit moment zijn. Dit wil niet zeggen dat deze modellen geen beperkingen hebben, er blijft door nieuwe wetenschappelijke inzichten altijd behoefte aan verbeteringen van de modellen of het ontwikkelen van geheel nieuwe fibrose modellen.

Daarom is het tweede directe doel de fibrose modellen waar nodig verder te verbeteren door middel van:

- 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).

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

TNO heeft een zeer uitgebreid track record op dit gebied. Onderzoekers binnen de groep doen al meer dan 20 jaar onderzoek op het gebied van extracellulaire matrix aanmaak en afbraak. Daarnaast heeft TNO sinds 15 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 15 jaar meer dan 100 samenwerkingsprojecten (zowel bilateraal als in grotere consortia) uitgevoerd.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet- en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

x

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

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.

Het ontstaan van fibrose is een proces van jaren en eenmaal in gang is gezet is het niet meer terug te draaien.

In de toekomst zal meer preventie van fibrose mogelijk zijn door het opvolgen van leefstijladviezen (meer bewegen, gezonder eten, niet roken, niet drinken ed), maar voor de huidige patiënten heeft dit nog weinig zin en blijft aanvullende medicatie noodzakelijk.

Ook is niet alle fibrose te herleiden naar een slechte leefstijl. Je kan ook longfibrose ontwikkelen als je nog nooit gerookt hebt, dus behandeling blijft noodzakelijk.

Fibrose is een chronische aandoening die tot ernstige gezondheidsproblemen kan leiden en heeft levensbedreigende aspecten als het de long, lever of nier betreft. De klinische noodzaak om fibrose te kunnen behandelen is groot (45% van alle mortaliteit heeft een fibrotische component) maar er zijn nog nauwelijks goede behandelmethoden beschikbaar.

TNO hoopt met het testen van nieuwe therapeutica te kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen tegen fibrose. Deze geneesmiddelen zullen leiden tot een aanzienlijke verhoging en verbetering van de kwaliteit van leven, besparing van zorgkosten en leiden tot meer arbeidsparticipatie van fibrosepatiënten.

Om dit mogelijk te maken is het essentieel dat naast het ontwikkelen van nieuwe therapieën de bestaande wetenschappelijke kennis over het ontstaan van fibrose en de daarvoor verantwoordelijke processen verder uitgebreid worden.

Longfibrose wordt gekenmerkt door kortademigheid, bindweefseldepositie (te zien op röntgenfoto) en ontsteking/fibrosis in het longweefsel. Door de fibrose worden de longen stugger en kunnen de longblaasjes minder zuurstof opnemen. 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 hepatitis B of C besmette patiënten, maar kan ook optreden bij andere leveraandoeningen zoals bijvoorbeeld NASH (niet-alcoholische steato-hepatitis). Bij al deze aandoeningen treedt dusdanige leverweefsel beschadiging op er leverfibrose volgt. Tijdens het genezingsproces worden de hepatocyten opgeruimd en vervangen door collageen (fibrose). De functie van de lever gaat hiermee achteruit. Het duurt vaak jaren voordat de ziekte zich ontwikkelt en klinische signalen optreden (bv geelzucht na hepatitis infectie, pijn in de buik, etc). 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.

Nierfibrose kan ontstaan door meerdere oorzaken, zoals nierontsteking, diabetes of hypertensie. Bij veel van deze aandoeningen kan zich chronisch nierfalen ontwikkelen, met klinische signalen als vermoeidheid, hoge bloeddruk, etc optreden. Hierbij ontwikkeld zich vaak fibrose in de verschillende compartimenten in de nier. Wanneer de nier is beschadigd, ontstaat een ontsteking die zich kan ontwikkelen tot 'end stage' nier fibrose. 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 2025 1,3 miljoen Nederlanders diabetes hebben, 44% van deze patiënten zal nefropathie en leverpathologie ontwikkelen. Huidfibrose (bijvoorbeeld in het ziektebeeld systemische sclerodermie of na verbranding) kan leiden tot ernstige gezondheidsproblemen. Beschadigde huidcellen worden vervangen door bindweefsel wat zich kenmerkt tot verharding van de huid. In de handen en het gezicht komt deze ziekte het meest voor. Samentrekking van bindweefsel kan hier leiden tot een sterk verlies van de functie van de hand en de mond.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

De patiënten met fibrose zullen gebaat zijn met nieuwe en betere anti-fibrotica aangezien er nu nog maar weinig medicatie op de markt is.

De betrokken onderzoekers van de fibrose studies zullen kennis vergaren van het algehele fibrotische proces en de werking van de geteste anti-fibrotica ontwikkelen.

De farmaceutische industrie die geïnteresseerd is in de ontwikkeling van nieuwe anti-fibrotica hebben belang bij de data van deze preklinische studies die worden uitgevoerd. Met de uitkomst van deze data zullen ze besluiten of ze wel of niet verder gaan met het testen van de stoffen in klinische studies.

TNO wil excellent onderzoek verrichten om anti-fibrotica naar de markt te helpen. In sommige gevallen zijn hierbij dierproeven de meest adequate manier om deze vraagstelling te beantwoorden. **De studies die TNO voor externe partners uitvoert, vinden meestal op fee-for-service basis plaats. Hiermee is er voor TNO ook een commercieel belang.**

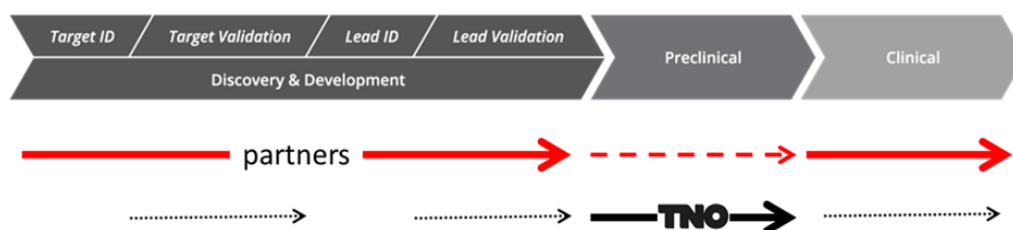
De muizen in deze studies zijn belanghebbend aangezien ze een grote rol in het onderzoek spelen. Hoewel ze geen zeggenschap hebben in de uitvoering, zullen de meeste muizen fibrose geïnduceerd krijgen. Echter zullen de dieren zeer goed gemonitord worden, zodat ze zo min mogelijk lijden en pijn zullen ervaren.

Verder zullen ze in groepen gehuisvest worden en voldoende kooiverrijking krijgen zoals knaaghoutjes, nestmateriaal, koker, kartonnen huisje.

3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en beslisriteria.

Het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen 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). Hierna worden stoffen (leads) ontwikkeld die het target kunnen beïnvloeden (bv remmende antilichamen, small molecules, RNA therapie, virale therapieën) 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 en 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 of het onderzoeken van de pathologische processen betrokken bij fibrose, maken wij voornamelijk gebruik van onderstaande 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
- Bleomycine-geïnduceerde huid-longfibrose (gecombineerd model)
- CCl₄-geïnduceerde leverfibrose
- Ureter obstructie geïnduceerde nierfibrose
- **Spontane leverfibrose in transgene of knock-out muizen zoals de MDR2-KO muis.**

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. Om onnodig proefdiergebruik te voorkomen wordt er altijd aan de partner gevraagd wat er al bekend is van de te testen stof zoals de veiligheid en op welke targets de te testen stof een effect zal hebben.

TNO heeft voor al deze verschillende fibrose modellen uitgebreide transcriptoom datasets beschikbaar. Hierin kan vooraf worden gekeken of de targets ook inderdaad bij fibrose processen betrokken zijn en of het dus wel zinvol is om de betreffende compound in een in-vivo studie te testen.

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 zijn. Tien tot twintig procent van de dieren in deze aanvraag zullen gebruikt worden om meer kennis te krijgen over de processen in de fibrose modellen, pathways te **identificeren** of om bijvoorbeeld nieuwe read-out mogelijkheden te ontwikkelen. Daarnaast zullen we onder deze projectaanvraag ook nieuwe diersmodellen ontwikkelen of de huidige modellen aanpassen met bijvoorbeeld siRNA of virussen.

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

De meeste studies die uitgevoerd zullen worden hebben betrekking op het testen van nieuwe anti-fibrotische geneesmiddelen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van **zes** verschillende diersmodellen voor fibrose die tezamen het overgrote deel van de humane klinische ontwikkelingsgebieden afdekken. Deze modellen worden in de bijlage uitgebreid beschreven. **In het algemeen zal er, in overleg met de farma partner, voor gekozen worden voor het uitvoeren van een studie in één enkel model.**

Met onze transcriptoom database kunnen we vooraf kijken of een geneesmiddel wel kan werken in een van onze modellen. Verder proberen we kritische naar de onderzoeksvraag van de klant te kijken en of deze in

onze modellen wel beantwoord kan worden. Er wordt altijd gestreefd om de best mogelijke studiedesigns aan te bieden.

Nadat de studie eenmaal is gestart, zijn er geen verdere keuze momenten meer.

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Fibrose in huid, long, huid/long, lever en nier in de muis.
2	